



Master Biologie, Géosciences, Agronomie, Environnement
Spécialité : Biologie et Evolution des Plantes

Parcours : M2 Biologie Fonctionnelle des Plantes

Année Universitaire 2007-2008

Activation de la voie des oxylipines chez le cotonnier
en réponse à la bactériose

Mise en évidence d'une 13-lipoxygénase induite
lors de l'interaction incompatible
Gossypium hirsutum* avec *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum
et lors de traitements hormonaux

Christine SANIER

Institut de Recherche pour le Développement (IRD)
UMR **RPB** (Résistance des Plantes aux Bioagresseurs)
Equipe Mécanismes de Défense des Plantes aux Bioagresseurs

Soutenu le 13 Juin 2008

Encadrants : Philippe MARMEY et Michel NICOLE



REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Michel Nicole, Directeur de l'UMR Résistance des Plantes aux Bioagresseurs, pour m'avoir chaleureusement accueillie au sein de son laboratoire. Grâce à lui, j'ai pu effectuer un stage très enrichissant et bénéficier de ses encouragements et conseils pour mûrir ma réflexion.

Je remercie particulièrement mon maître de stage, Philippe Marmey pour la qualité de son encadrement, sa disponibilité, et ses précieux conseils, en particulier lors de la rédaction du mémoire, malgré ses problèmes de dos.....

Merci à tous les membres de l'équipe Mécanismes, et aux chercheurs accueillis grâce auxquels j'ai effectué un stage dans de très bonnes conditions : Diana, Anthony, Jean-Luc et Louis.

Merci aussi à Agnès et Sylvie pour leurs encouragements et leur bonne humeur permanente.

Merci aux vacataires, stagiaires et doctorants : Joan, Naoual, Stelly, Michèle, Majd, Nills, Drissa et les brésiliens Erika et Daniel pour leur sympathie et leur soutien.

Merci à Jamel pour sa sportive bonne humeur.

Merci enfin aux techniciens, chercheurs des autres équipes de l'UMR pour la bonne ambiance de travail.

RESUME

L'interaction entre le cotonnier (*Gossypium hirsutum*) variété Réba B50, portant les gènes de résistance B₂B₃, et la bactérie *Xanthomonas campestris* p.v. *malvacearum* est gouvernée par une relation gène pour gène. Lors de l'interaction incompatible, survenant avec la race *Xcm*18, on observe une réaction hypersensible caractérisée par la mort des cellules infectées due en partie à la peroxydation des lipides membranaires. Celle-ci est corrélée à une activité 9-lipoxygénase et une augmentation de la transcription du gène *GhLOX1* codant pour une putative 9-LOX. Un autre gène *GhLOX2* codant pour une putative 13-LOX a été cloné. Son implication dans la voie de biosynthèse du jasmonate, dont on observe une accumulation précoce 2 heures après infection durant la HR, est envisagée. L'étude de l'expression de *GhLOX2* par PCR quantitative, au cours de l'infection par les deux races *Xcm* 18 (avirulente) ou *Xcm* 20 (virulente) a été réalisée, ainsi qu'en réponse à divers traitements hormonaux (MeJA, SA, ET). Les résultats montrent une expression différentielle de *GhLOX2* en fonction de la race inoculée et une réponse variable aux différents traitements par rapport à *GhLOX1*. L'implication possible de *GhLOX2* dans la voie de biosynthèse de JA est discutée.

Mots clés : lipoxygénase, réaction hypersensible, *Xanthomonas campestris*, *Gossypium hirsutum*, qPCR, acide jasmonique, acide salicylique, éthylène.

ABSTRACT

Interactions between cotton (*Gossypium hirsutum*) Réba B50, a B₂B₃-containing resistance genes cultivar, and the pathogenic bacteria *Xanthomonas campestris* p.v. *malvacearum* are based upon the gene-for-gene concept. During the incompatible interaction, with the *Xcm* 18 race, an hypersensitive reaction occurred, characterized by the death of infected cells in relation with peroxidation of membrane lipids. This one is correlated with a 9-lipoxygenase activity and an increase of *GhLOX1* transcription, that is a putative 9-LOX. An other gene *GhLOX2* encoding a putative 13-LOX, was cloned. Its implication in biosynthesis of jasmonic acid, whose accumulation was observed 2 hours post inoculation during HR, is suspected. Analysis of *GhLOX2* gene expression by quantitative PCR during infection by *Xcm* 18 (avirulent race) or *Xcm* 20 (virulent race) was performed, as well as in response to different hormonal treatments (MeJA, SA, ET). Data show that *GhLOX2* is differentially expressed according to race inoculation, and to the different hormones as compared to *GhLOX1*. The putative implication of *GhLOX2* in JA biosynthesis is discussed.

Keywords : lipoxygenase, hypersensitive reaction, *Xanthomonas campestris*, *Gossypium hirsutum*, jasmonic acid, salicylic acid, ethylen.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADNc : ADN complémentaire
AGPI : acide gras polyinsaturé
AOC : allène oxyde cyclase
AOPD : 12-oxo-phytodiénoïque
AOS : allène oxyde synthase
AP2 : apétala 2
cfu : colony forming unit
Ct : cycle treshold/cycle seuil
DES : divinyle éther synthase
ERF : éthylène response factor
EST : expressed sequence tag
ET : éthylène
Gh : *Gossypium hirsutum*
hpi : heure post-inoculation
HPL : hydroperoxyde lyase
JA : acide jasmonique
LOX : lipoxygénase
MeJA : méthyl jasmonate
mpi : minute post-inoculation
OPR : AOPD réductase
PCR : polymerase chain reaction
POX : peroxygénase
RH : réponse hypersensible
RNAi : ARN interférence
SA : acide salicylique
SOD : superoxyde dismutase
TMV : tabac mosaïc virus
Xcm : *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*

SOMMAIRE

1.	INTRODUCTION	1
1.1	Le cotonnier	1
1.2	La culture cotonnière	1
1.3	La bactériose du cotonnier	1
1.4	La réaction hypersensible	2
1.5	Caractérisation physiologique et moléculaire de l'interaction cotonnier Réba B50/ <i>Xcm</i>	2
1.6	La voie des oxylipines et les lipoxygénases	3
1.7	Présentation du sujet de stage	4
2	RESULTATS	6
2.1	Analyse des phénotypes obtenus après traitements par <i>Xcm</i>	6
2.2	Mise au point de la PCR quantitative pour les gènes <i>GhLOX1</i> et <i>GhLOX2</i>	6
	- <i>Choix du gène de référence</i>	6
	- <i>Choix et validation des amorces</i>	6
	- <i>Validation des cinétiques</i>	7
2.3	- Analyse des cinétiques d'infections par PCR quantitative	7
	- <i>GhLOX1</i> marqueur de la RH	7
	- <i>GhLOX2</i> au cours de la RH	7
2.4	Analyse par PCR quantitative de l'effet des traitements MeJA, SA et Ethylène	8
	- <i>Traitement par le MeJA</i>	8
	- <i>Traitement par le SA</i>	8
	- <i>Traitement par l'éthylène</i>	9
2.5	Identification d'un deuxième gène 13-LOX, <i>GhLOX3</i> , présent chez Réba B50	9
2.6	Analyse par PCR quantitative des cinétiques d'infections et des traitements pour <i>GhLOX3</i>	9
	- <i>Cinétiques d'inoculation avec Xcm</i>	9
	- <i>Traitement par le MeJA</i>	10
	- <i>Traitement par le SA</i>	10
	- <i>Traitement par l'éthylène</i>	10

2.7	Recherche du cDNA pleine longueur de <i>GhLOX2</i>	10
3	DISCUSSION	11
4	MATERIEL ET METHODE	16
4.1.	Matériel végétal et culture du cotonnier	16
4.2.	Souches bactériennes et inoculations des plants de cotonnier	16
4.3	Traitements des cotylédons avec MeJA, SA et ET	16
4.4	Préparation des ARN et transcription inverse	17
4.5	PCR quantitative	17
4.6	Bioinformatique	17
4.7	PCR et clonage	18
	REFERENCES	19
	ANNEXES	25

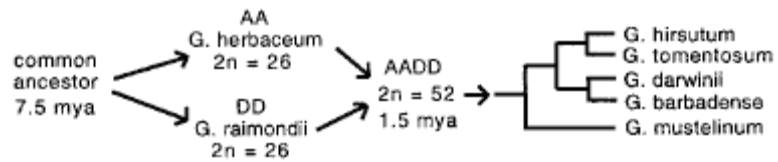


Figure 1 : Représentation de la phylogénie de *Gossypium* diploïde et allopolyploïde.
La polyploïdie s'est produite il y a 1,5 millions d'années après hybridation entre les génomes diploïdes A et D. L'ancêtre tétraploïde s'est ensuite diversifié en 5 espèces. D'après Adams *et al.* 2003.



Figure 2 : Symptômes observés sur feuille et tige de cotonnier suite à la bactériose causée par *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*.

INTRODUCTION

1.1 Le cotonnier

Le cotonnier appartient au genre *Gossypium*, famille des malvacées. Il serait issu d'un *phylum* ancestral aujourd'hui disparu, mais qui se serait différencié en 8 groupes génomiques sous l'influence de la pression sélective induite par la dérive des continents (Ndungo *et al.*, 1988). Ce genre comprend 50 espèces répertoriées dont 45 sont diploïdes et 5 tétraploïdes (Wendel et Cronn, 2003). Quatre d'entre elles seulement ont été domestiquées pour former le groupe des espèces cultivées (Figure 1). Il s'agit de deux espèces diploïdes ($2n=26$) du génome A, *G. herbaceum* et *G. arboreum*, originaires d'Afrique et d'Asie produisant un coton dit « indien » à fibres épaisses et courtes, et de deux autres espèces tétraploïdes ($2n=52$) du génome AD, *G. hirsutum* et *G. barbadense*, originaires d'Amérique et Afrique-Asie, produisant pour *G. hirsutum* le coton dit égyptien à fibres longues et fines, et pour *G. barbadense*, un coton à fibres de caractéristiques intermédiaires (Konan et Mergeai, 2007).

1.2 La culture cotonnière

La culture du cotonnier (*Gossypium* sp.) couvre près de 30 millions d'hectares, soit 2,5% des terres arables de la planète, avec l'espèce *G. hirsutum* fournissant près de 94 % de la production mondiale (Konan et Mergeai, 2007). Elle occupe une place prépondérante parmi les fibres naturelles cultivées (40% de la consommation par l'industrie textile) et constitue également une source de protéines et d'huile végétale comestible (Estur, 2006). Le cotonnier est particulièrement cultivé dans les régions arides et semi-arides des zones tropicales et subtropicales. L'Afrique francophone est le troisième exportateur mondial de fibres, après les Etats-Unis et les pays d'Asie centrale (Texier, 1996). Cette culture est cependant victime de nombreuses maladies dont les pertes de récolte peuvent atteindre plus de 30%, allant même jusqu'à la destruction quasi-totale de la récolte. Parmi les maladies les plus dommageables, on compte la bactériose du cotonnier ou brûlure bactérienne, causée par *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (*Xcm*).

1.3 La bactériose du cotonnier

La bactériose du cotonnier est endémique aux principales zones de culture (Hillocks, 1992). La première description détaillée de la maladie a été faite aux Etats-Unis (Atkinson, 1891). La bactériose se manifeste sur les parties aériennes de la plante, causant des taches nécrotiques huileuses sur les cotylédons, les feuilles et les fruits, voire sur les tiges et les rameaux fructifères, causant des défoliations et des chancres (Figure 2) (Innes, 1983; Zomorodian et

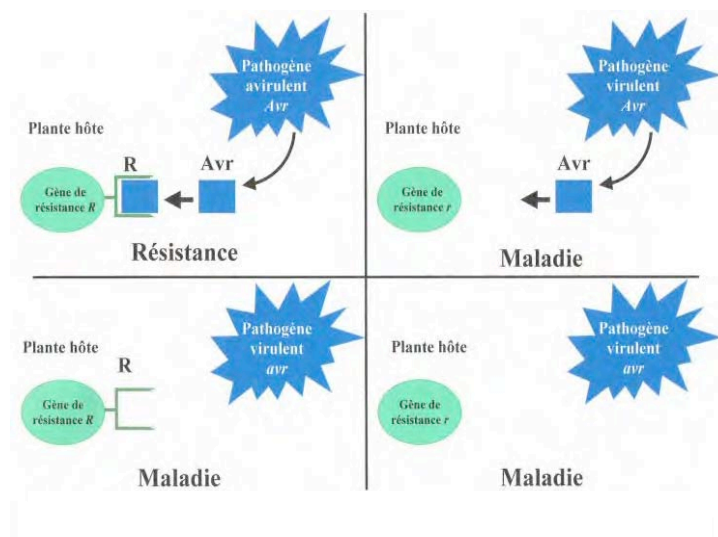


Figure 3 : La théorie « gène-pour-gène ». *R Avr*: gènes dominants. *R avr*: gènes récessifs. R: produit du gène *R*. Avr: produit du gène *Avr*. D'après Buhot, 2003

Génotype	Gènes de résistance	Race	Phénotype observé
Réba B50	B_2B_3	<i>Xcm</i> 18	Réaction hypersensible
Réba B50	B_2B_3	<i>Xcm</i> 20	Maladie

Figure 4 : Déterminisme génétique de la réaction hypersensible chez le cotonnier.



Figure 5 : Symptômes observés sur les cotylédons suite à l'inoculation par *Xcm* 18, *Xcm* 20 ou H₂O. D'après Sayegh-Alhamdia *et al.*, 2008.

Rudolph, 1993). Elle se transmet par la semence, et se trouve être particulièrement dévastatrice en début de culture et en période de température et d'hygrométrie élevées.

Avec l'intensification de la culture du cotonnier dans les cinquante dernières années, la bactériose du cotonnier est apparue comme un facteur limitant pour cette culture, aux Etats-Unis (Shnathorst *et al.*, 1960) comme en Afrique (Follin *et al.*, 1988). Le traitement chimique des semences, l'amélioration des techniques culturales et les programmes d'amélioration variétales ont permis de contrôler dans un premier temps la maladie (Brinkerhoff, 1970; Brinkerhoff *et al.*, 1984). De nombreux génotypes résistants à la bactériose ont ainsi été déployés au champ (Bird *et al.*, 1981). Mais après 30 ans de succès en Afrique, cette approche est remise en cause par l'apparition de nouvelles souches virulentes de la bactérie, telles les races 20, 21 et 22 de *Xcm*, capables de contourner les résistances (Hillocks, 1992; Delannoy *et al.*, 2005).

1.4 La réaction hypersensible

L'interaction entre le cotonnier et *Xcm* est gouvernée par le concept de relation gène-pour-gène (Flor, 1971) dont le phénotype est la réaction hypersensible (RH) (Hammond-Kosack et Jones, 1997; Morel et Dangl, 1997). Au gène d'avirulence de l'agent pathogène correspond un gène de résistance chez la plante (Figure 3) (Staskawicz *et al.*, 1995). Des interactions compatibles ou incompatibles ont ainsi été identifiées entre différentes races de *Xcm* et variétés de cotonnier (Gabriel *et al.*, 1986). Dix-neuf races de *Xcm* capables d'induire des réponses résistantes ou sensibles ont été répertoriées et plusieurs gènes d'avirulence de la famille *avrBs3* ont été clonés (De Feyter *et al.*, 1993). Dix huit gènes majeurs conditionnant la résistance à la bactériose ont été identifiés et utilisés dans les programmes d'amélioration du cotonnier (Hillocks, 1992).

L'interaction entre le cultivar Réba B50, contenant les gènes de résistance B₂B₃ et la race 18 de *Xcm*, conduit à une RH (Nicole *et al.*, 1998) provoquant des lésions nécrotiques sèches et la résistance de la plante (Figures 4 et 5). Ce cultivar est en revanche sensible à la race 20, qui induit des symptômes pouvant entraîner la mort de la plante. L'interaction Réba B50 – race 18 ou 20 de *Xcm* sera le modèle biologique de notre étude.

1.5 Caractérisation physiologique et moléculaire de l'interaction cotonnier Réba B50/*Xcm*

La RH du cotonnier est étudiée depuis de nombreuses années pour mieux comprendre la mise en place de ce phénomène de résistance naturelle de la plante. Plusieurs évènements,

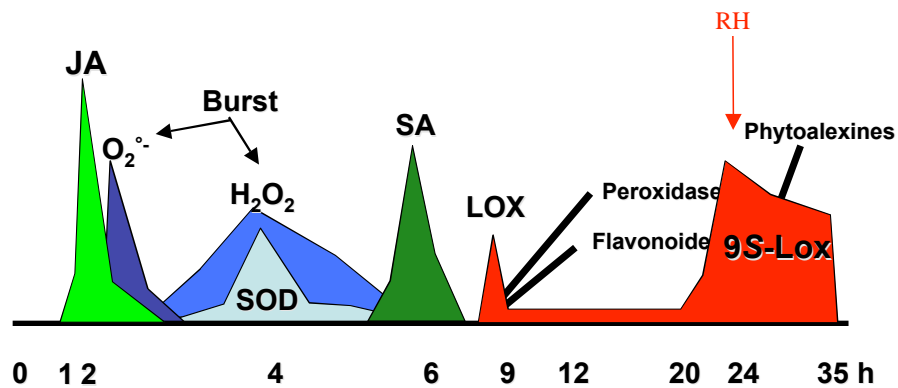


Figure 6 : Représentation graphique de la séquence d'événements physiologiques mis en évidence lors de la réaction hypersensible chez le cotonnier

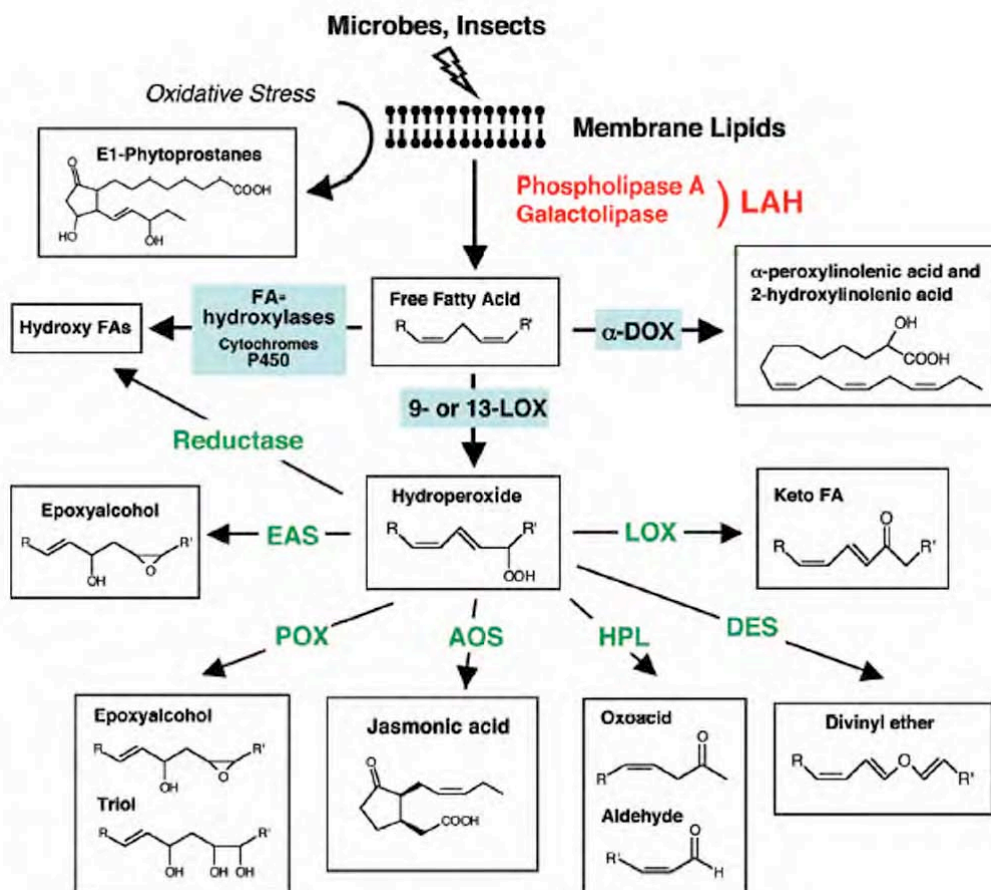


Figure 7 : Schéma simplifié de la voie de biosynthèse des oxylipines. AGPI : acide gras polysaturé ; AOC : allène oxyde cyclase ; AOS : allène oxyde synthase ; DES : divinyléther synthase ; alpha-DOX : alpha-dioxygénase ; HPL : hydroperoxyde lyase ; LOX : lipoxygénase ; OPR : 12-oxo-phytodiénoate réductase ; POX : peroxygénase. D'après Heitz *et al.*, 2002

physiologiques, ont été mis en évidence dans le cas de la RH (Figure 6), tels que :

- une accumulation d'acide jasmonique 2 heures après inoculation (hpi) (Delannoy *et al.*, 2005)
- un burst oxydatif, 3 hpi (Martinez *et al.*, 1998; Delannoy *et al.*, 2003)
- la production d'acide salicylique (SA), 6 hpi (Martinez *et al.*, 2000)
- la production de composés phénoliques, dont les flavonoïdes, 9 hpi (Dai *et al.*, 1996) et les phytoalexines, 24 hpi (Davis *et al.*, 1996).

Plusieurs gènes différentiellement transcrits ont été associés à ces étapes, comme ceux codants pour des peroxydases (Delannoy *et al.*, 2003) et les superoxide dismutases (SOD) (Voloudakis *et al.*, 2006).

L'un des événements majeurs observés lors de la RH est une peroxydation des lipides associée à la perte en eau des cellules et l'apparition des symptômes RH (Jalloul *et al.*, 2002). Cette peroxydation résulte de l'augmentation de l'activité d'une lipoxygénase (LOX) maximale à 18-24 hpi et qui produit des 9-hydroperoxydes. Lors de la maladie (réaction compatible) l'activité 9-LOX apparaît plus tardivement et plus faiblement, en même temps qu'une chlorose sur les feuilles. Un gène codant pour une LOX a été cloné (*GhLOX1*) et l'analyse de sa séquence montre qu'il coderait pour une 9-LOX (Marmey *et al.*, 2007). *GhLOX1* est préférentiellement induit lors de la RH, juste avant l'activité 9-LOX détectée (Marmey *et al.*, 2007).

1.6 La voie des oxylipines et les lipoxygénases

Les oxylipines sont des produits oxydés dérivés du catabolisme des acides gras polyinsaturés qui peuvent réguler des voies de signalisation de défense chez les plantes (Eckardt, 2008). La peroxydation des lipides résulte d'une action chimique ou enzymatique telle celle réalisée par les LOX (EC 1.13.11.12) (Porta et Rocha-Sosa, 2002). Chez les plantes, les LOX catalysent la dioxygénation régio- et stéréospécifique d'acides gras polyunsaturés (AGPI) contenant une structure cis, cis 1,4-pentadiène, tels que les acides linoléique ou linolénique. Les LOX catalysent l'insertion d'oxygène moléculaire dans une région spécifique de la molécule, sur les carbones 9 ou 13, formant ainsi deux groupes de composés, les 9-hydroperoxydes ou les 13-hydroperoxydes (Grechkin, 1998). C'est le début d'une cascade d'événements, la voie de signalisation initiée par les LOX, dans laquelle les hydroperoxydes produits sont les substrats d'une variété d'enzymes (Feussner et Wasternack, 2002). Quatre voies métaboliques majeures y contribuent : la voie peroxygénase (POX), divinyl ether synthase (DES), allène oxyde

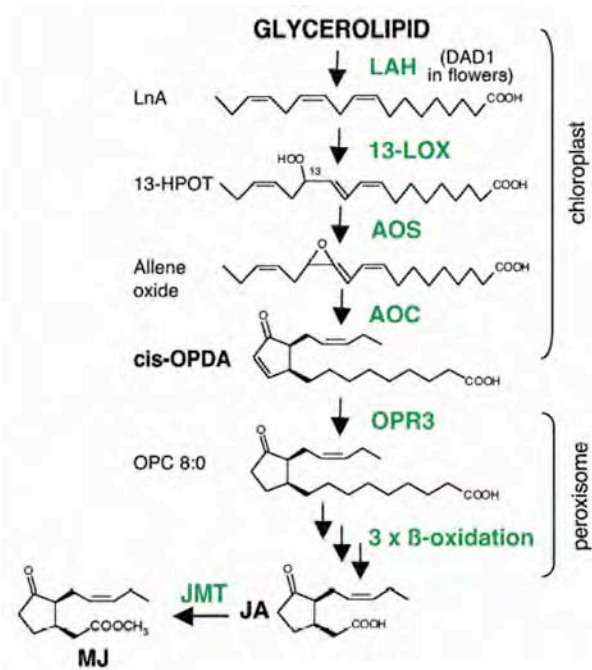


Figure 8 : La voie détaillée des 13-LOX, et la biosynthèse de JA. D'après La Camera *et al.*, 2004.

synthase (AOS) et hydroperoxyde lyase (HPL) (Figure 7). Les deux dernières voies conduisent respectivement aux jasmonates et aux aldéhydes, et sont responsables de la production de molécules signal. Certaines de ces molécules sont associées à la résistance à des agents pathogènes, soit directement par leurs propriétés antimicrobiennes, soit en tant que signaux cellulaires (comme les jasmonates) induisant des gènes de défense ou encore régulant la mort cellulaire chez l'hôte (La Camera *et al.*, 2004).

Une des oxylipines la mieux caractérisée est aujourd'hui l'acide jasmonique (JA). La voie de biosynthèse conduisant aux jasmonates présente des analogies avec la biosynthèse des prostaglandines chez les animaux au cours de la réponse inflammatoire (Bergey *et al.*, 1996). L'hydroperoxyde généré par une 13-LOX est converti en un allène oxyde instable qui est cyclisé par une allène oxyde cyclase (AOC) en acide 12-oxo-phytodienoïque (AOPD) ensuite réduit par une AOPD réductase (OPR) (Figure 8). La chaîne latérale est raccourcie par trois cycles de bêta-oxydation pour conduire au JA. Le JA ainsi que son précurseur l'acide 12-oxo-phytodienoïque (OPDA) s'accumulent à la suite de stress, tels que la blessure ou l'infection par un pathogène (Block *et al.*, 2005). Le JA s'accumule après blessure chez le soja (Creelman *et al.*, 1992), ou au site d'infection du virus de la mosaïque du tabac (TMV) chez le tabac (Kenton *et al.*, 1999). L'action du jasmonate, ou de sa forme volatile le Methyl Jasmonate (MeJA), est importante dans la réponse à un stress de la plante (Wasternack, 2007).

La voie de signalisation du JA est de plus en plus étudiée, car celle-ci pourrait être l'une des molécules qui « organise » la réponse de défense chez les plantes. Plusieurs familles de facteurs de transcription sont régulées par le JA, dont les *ERF* (Ethylene Response Factors) impliqués dans les mécanismes de résistance d'*Arabidopsis* aux agents pathogènes nécrotrophes (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002). L'expression de *ERF1* est contrôlée par le JA et l'éthylène, suggérant une interaction entre ces voies de signalisation (Lorenzo *et al.*, 2003). Récemment, un facteur de transcription ERF isolé de *G. hirsutum*, *GhERF1*, et contenant un motif AP2/ERF, répondait aussi à des conditions de stress (Qiao *et al.*, 2008).

1.7 Présentation du sujet de stage

La peroxydation des lipides est une étape clé dans la RH du cotonnier, car liée à la perte en eau des cellules et l'apparition des symptômes RH (Jalloul *et al.*, 2002). *GhLOX1* pourrait être le gène responsable de cette peroxydation, de par sa transcription après infection. Récemment, il a été mis en évidence que ce gène est systématiquement activé lors des

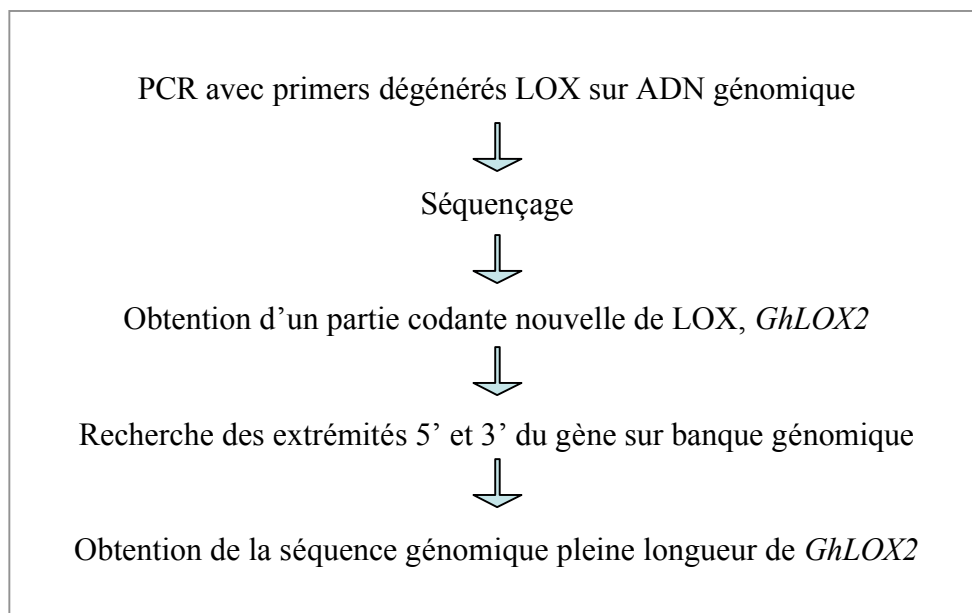


Figure 9 : Stratégie de clonage du gène *GhLOX2*.

	584
GhLOX1	VLELT V FPGKYAME
GhLOX2	IIERT F CPGKYSLE
AtLOX1	IFEIT V FPSKYAME
SoyLOX1	IIETT F LPSKYSVE
CuLOX	LIETT H YPSKYSME

Figure 10 : Alignement des séquences protéiques de plusieurs lipoxygénases pour le motif déterminant la spécificité de l'enzyme. Les séquences des LOXs sont déposées dans GenBank sous les numéros d'accessions suivants: DQ861284 pour GhLOX1, NP_175900.1 pour AtLOX1, J02795 pour SoyLOX1, X92890 pour CuLOX. Le numéro indique la position de l'acide aminé pour GhLOX1.

réactions hypersensibles induites par les interactions incompatibles *Xcm*/cotonnier (Sayegh-Alhamdia *et al.*, 2008). *GhLOX1* serait ainsi un gène marqueur de la RH.

Un deuxième gène LOX de cotonnier, *GhLOX2*, a été cloné. Sa séquence a été obtenue en utilisant dans un premiers temps des primers dégénérés sur une banque génomique de Réba B50, puis en recherchant les extrémités 5' et 3' du gène. La séquence génomique pleine longueur de *GhLOX2* a ainsi été obtenue (Figure 9). L'analyse bioinformatique de la séquence révèle que ce gène coderait pour une LOX de type 13 (Figure 10).

L'accumulation de JA 2 hpi est une particularité de la RH chez le cotonnier (Jalloul, 2002 ; Delannoy *et al.*, 2005). Cette hormone semble avoir un rôle prépondérant dans la mise en place de la résistance à *Xcm*. Sachant qu'une des voies de biosynthèse du JA fait intervenir une LOX de type 13, mon travail de stage a donc consisté à étudier le rôle possible du gène *GhLOX2* dans la RH du cotonnier. Pour ce faire, nous avons réalisé des inoculations du cultivar Réba B50 avec les races avirulente (*Xcm* 18) ou virulente (*Xcm* 20). Les cinétiques ont privilégié les temps précoces et l'analyse de la transcription de *GhLOX2* s'est faite par PCR quantitative. De même, l'expression de *GhLOX2* a été étudiée en réponse à différents traitements par des hormones (JA, SA, éthylène) connues pour leur rôle dans la signalisation de la résistance des plantes.

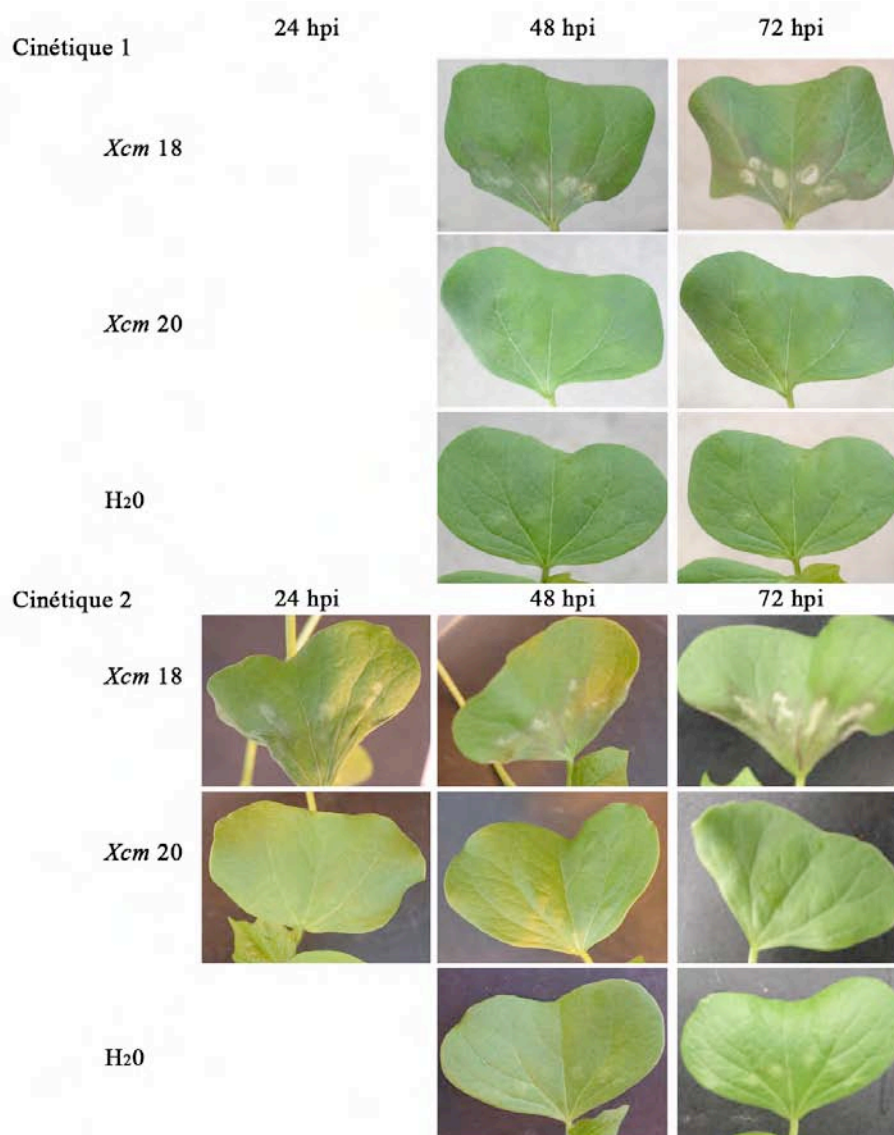


Figure 11 : Symptômes observés sur les cotylédons de cotonnier inoculés par la race *Xcm* 18, *Xcm* 20 ou par H₂O, pour les deux cinétiques d'infection.

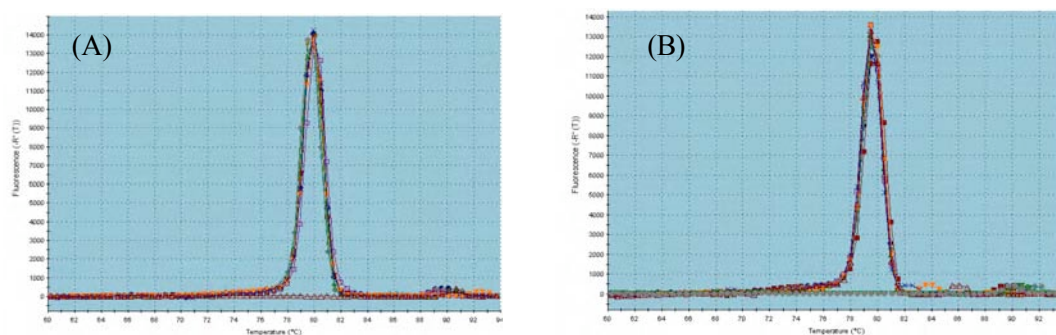


Figure 12: Courbes de fusion validant les amorces spécifiques de qPCR pour *GhLOX1* (A) et *GhLOX2* (B).

2 RESULTATS

2.1 Analyse des phénotypes obtenus après traitements par *Xcm*

Une expérimentation de traitements de cotonnier par *Xcm* consistait à infiltrer des cotylédons de la variété Réba B50 par trois solutions distinctes : la race 18 de *Xcm* (avirulente), la race 20 de *Xcm* (virulente) et H₂O. Les prélèvements ont été faits de manière méthodique, de 15 minutes post-inoculation (mpi) à 48 hpi. Les plantes témoins, notées T0, étaient non traitées et prélevées en même temps que les plantes 15 mpi.

Deux expérimentations ont pu être conduites. Les plantes des deux cinétiques présentent des symptômes de RH lorsque la solution infiltrée est *Xcm* 18 (Figure 11). Aucune lésion nécrotique n'est visible sur des cotylédons infiltrés avec *Xcm* 20 ou H₂O, et ceci jusqu'à 144 hpi (résultats non montrés). Il faut cependant souligner que la cinétique 2 a montré l'apparition de symptômes de RH plus précoces, visibles dès 24 hpi. Ceux-ci n'étaient pas détectables à 24 hpi pour la cinétique 1.

2.2 Mise au point de la PCR quantitative pour les gènes *GhLOX1* et *GhLOX2*

La technique de la PCR quantitative permet de suivre en temps réel l'expression d'un gène cible par rapport à un gène de référence. Cette méthode nécessite une mise au point rigoureuse.

Choix du gène de référence

Le gène de référence choisi est l'actine de cotonnier. Parmi cette famille multigénique, le gène *GhAct2* a été privilégié. En effet, une étude a montré par PCR quantitative que ce gène était le plus exprimé des gènes codant pour l'actine, avec une efficacité proche de 100 % pour le couple d'amorces sélectionnées (Li *et al.*, 2005).

Choix et validation des amorces

Le choix des amorces s'est fait par le logiciel Beacon Designer Premier Biosoft International, Etats-Unis). Le logiciel propose des couples d'amorces pour un gène choisi en imposant des contraintes au couple d'amorces (taille, T_m, self-dimer, cross-dimer). Plusieurs couples d'amorces ont été testés par PCR quantitative. La validation des amorces se fait par le biais des courbes de fusion (Figure 12). Ces courbes sont réalisées en fin de PCR et permettent de calculer les T_m des amplicons. L'observation d'un seul pic démontre qu'un seul produit a été amplifié. Cette approche a permis de privilégier un couple d'amorces pour *GhLOX1* et

Gene	Amorces	Sequence
<i>Actin</i>	GhACT2-F	CAG CAC CTT CCA GCA GAT G
	GhACT2-R	CAC TTG ACA CGG CAC ACC
<i>GhLOX1</i>	LOX1-3-QF	GCT TGA CCA GGC ACT TCC
	LOX1-3-QR	GCA AAC CAA ATC TCC AGT CC
<i>GhLOX2</i>	LOX2-QF4	ATC TCT GGA CGA CCT TGA C
	LOX2-QRV4	CTT GTA GTA GAA TGA GCA GTA ATC

Tableau 1: Amorces sélectionnées pour la PCR quantitative pour les gènes *Actin*, *GhLOX1* et *GhLOX2*

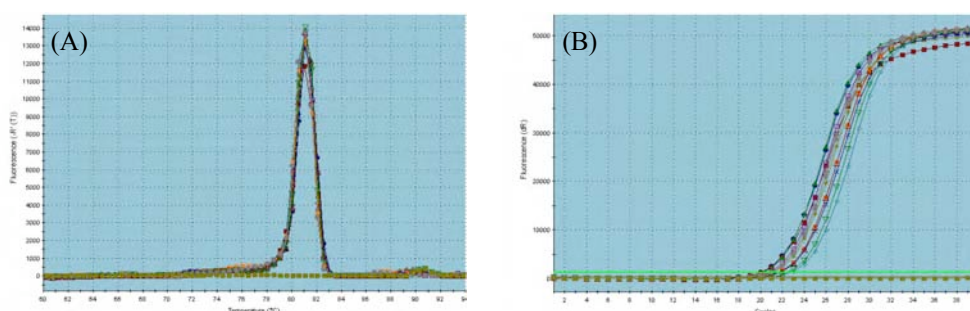


Figure 13: Résultats de PCR quantitative pour le gène de référence (Actine) pour des échantillons d'une cinétique d'infection. (A) représente les courbes de fusion et (B) les courbes d'amplification de l'actine, révélant ainsi une bonne homogénéité des ADNc testés.

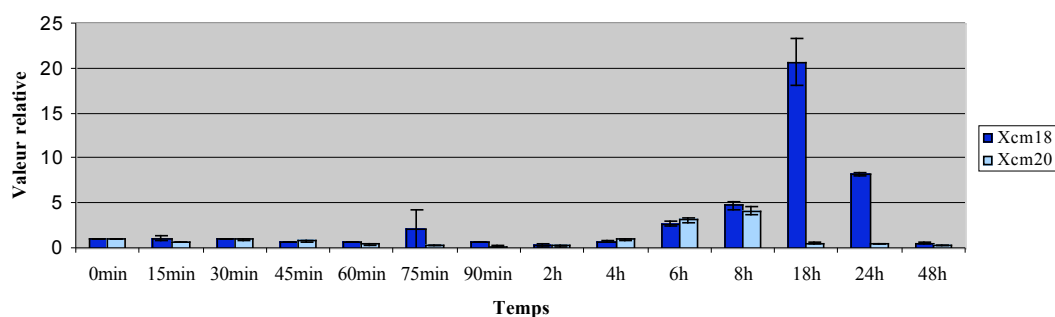


Figure 14: Analyse de l'expression de *GhLOX1* pour des cotylédons infiltrés avec *Xcm* 18 et *Xcm* 20. L'analyse par PCR quantitative concerne la cinétique d'infection 2. Les cotylédons étaient récoltés aux temps indiqués (0-48 h). L'expression de *GhLOX1* est rapportée au temps T0 (égale à 1) et normalisée par l'expression de *GhAct2* (2 répétitions méthodologiques).

	<i>GhAct2</i>	<i>GhLOX1</i>	<i>GhLOX2</i>
0 mn	20,77	26,35	37,75

Tableau 2: Valeur moyenne des cycles seuil (Ct) pour les gènes *GhAct2*, *GhLOX1* et *GhLOX2* au temps T0

GhLOX2 (Tableau 1).

Validation des cinétiques

Les cinétiques effectuées sur les expérimentations d'inoculations comprenaient 14 points de prélèvement. Il était indispensable de vérifier la qualité de ces cinétiques d'un point de vue qualité et dosage des cDNA en testant le gène de ménage actine par PCR quantitative. Il a été noté la présence d'un seul pic dans les courbes de fusions, un faible écart entre les Ct (cycles seuil) des divers échantillons de cinétiques testés (Figure 13) et une efficacité proche de 100%.

2.3 Analyse des cinétiques d'infections par PCR quantitative

Deux répétitions biologiques (appelées Cinétique 1 et Cinétique 2) ont été réalisées avec pour chacune d'elle une inoculation avec *Xcm* 18, *Xcm* 20 et H₂O. Dans la partie résultats, nous décrirons seulement l'analyse de l'une d'entre elle (Cinétique 2), pour une meilleure clarté des résultats. L'analyse de Cinétique 1 sera présentée en annexe (Annexes 1, 2 et 3). Toutes les expériences de PCR quantitative ont été doublées (deux plaques appelées *rep1* et *rep2*), l'échantillon étant déposé en duplica sur la plaque. Un échantillon infiltré par *Xcm* 18 et prélevé à 4 hpi de la deuxième cinétique sera appelé *Xcm* 18-4 hpi.

GhLOX1 marqueur de la RH

Nous avons dans un premier temps vérifié si *GhLOX1* était transcrit au cours de la cinétique réalisée, en utilisant les amorces spécifiques de ce gène adaptées à la PCR quantitative. La figure 14 représente le niveau de transcription de *GhLOX1* en réponse à *Xcm* 18 ou *Xcm* 20, du temps T0 à 48 hpi. La transcription de *GhLOX1* augmente faiblement de 4 hpi à 8 hpi, mais de manière identique pour *Xcm* 18 ou *Xcm* 20. En revanche, le niveau d'expression de *GhLOX1* est beaucoup plus important pour *Xcm* 18-18 hpi (près de 20 fois plus exprimé que *Xcm* 18-0 hpi) mais aussi pour *Xcm* 18-24 hpi. Pour ces deux temps de cinétique, le niveau d'expression de *GhLOX1* reste faible pour *Xcm* 20. *GhLOX1* est donc bien préférentiellement exprimé dans l'inoculation avec la race *Xcm* 18 au temps attendu après infection.

GhLOX2 au cours de la RH

L'étude de l'expression de *GhLOX2* a été analysée au cours des cinétiques 1 et 2. Pour l'ensemble des échantillons analysés, les Ct obtenus par PCR quantitative pour *GhLOX2* ont une valeur au dessus de 30, alors que le Ct pour *GhACT2* ou *GhLOX1* était compris entre 20 et 30 (Tableau 2). Ceci témoigne du faible niveau d'expression de *GhLOX2* par rapport au gène de référence ou à *GhLOX1*.

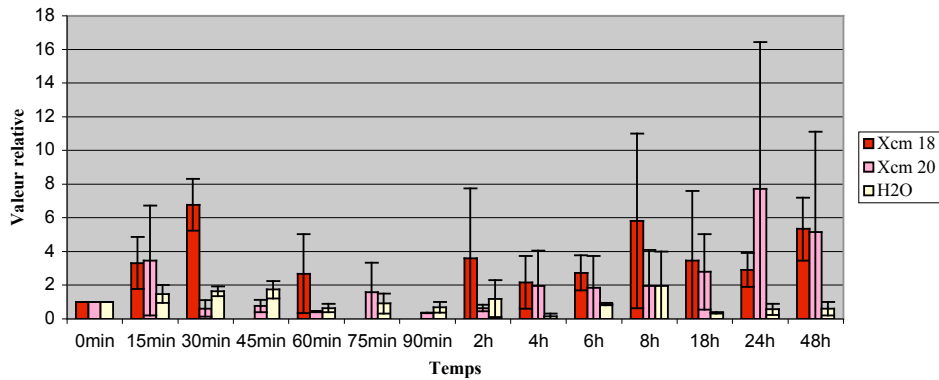


Figure 15: Analyse de l'expression de *GhLOX2* pour des cotylédons infiltrés avec *Xcm* 18 et *Xcm* 20 et H2O. L'expression de *GhLOX2* est rapportée au temps T0 (égale à 1) et normalisée par l'expression de *GhAct2* (2 répétitions méthodologiques).

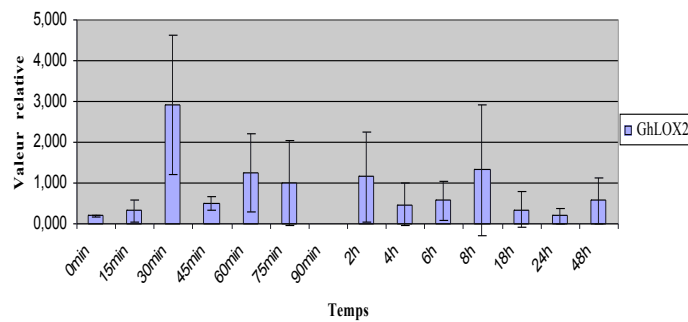


Figure 16: Analyse de l'expression de *GhLOX2* pour des cotylédons infiltrés avec *Xcm* 18 et *Xcm* 20. L'expression de *GhLOX2* est le ratio des valeurs d'expression obtenues pour *Xcm* 18 sur celles obtenues pour *Xcm* 20 pour un même temps après inoculation.

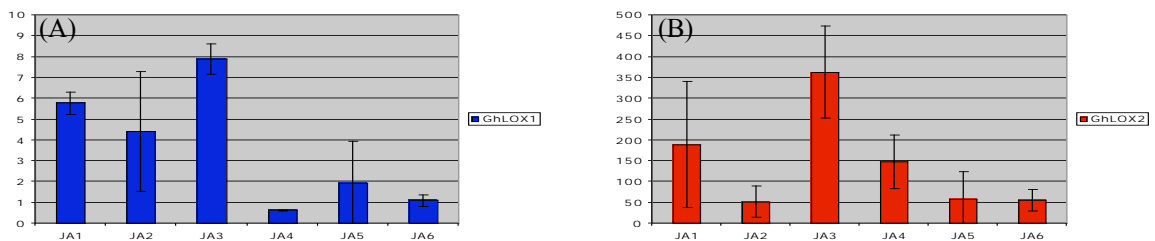


Figure 17: Analyse de l'expression de *GhLOX1* (A) et *GhLOX2* (B) pour des cotylédons traités avec Methyl Jasmonate. L'expression est rapportée par rapport au témoin correspondant et normalisée par l'expression de *GhAct2* (2 répétitions méthodologiques).

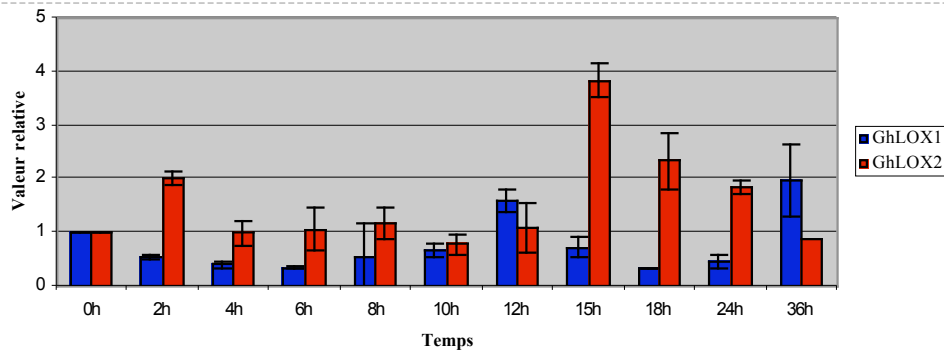


Figure 18: Analyse de l'expression de *GhLOX1* et *GhLOX2* pour des cotylédons traités à l'acide salicylique. L'expression de *GhLOX2* est rapportée au temps T0 (égale à 1) et normalisée par l'expression de *GhAct2* (2 répétitions méthodologiques).

La figure 15 représente la valeur relative de l'expression de *GhLOX2* pour l'inoculation avec *Xcm* 18 ou *Xcm* 20 (moyenne de *Rep1* et *Rep2*). La formule du calcul de la valeur relative est par exemple $\Delta Ct = ((Ct_{18-2h_{LOX2}} - Ct_{18-2h_{Act}}) - (Ct_{T0_{LOX2}} - Ct_{T0_{Act}}))$ pour l'échantillon *Xcm* 18-2 hpi. La lecture du diagramme fait apparaître une expression relative de *GhLOX2* plus importante et significative pour *Xcm* 18 par rapport à *Xcm* 20 et H₂O pour le point *Xcm* 18-30 min. La valeur relative est de 6,7 avec un faible écart-type.

La variabilité étant importante pour une grande majorité des points de la cinétique (grands écart-types), nous présentons alors le niveau d'expression de *GhLOX2* en valeur relative de l'expression quand inoculé par *Xcm* 18 / inoculé par *Xcm* 20 (Exemple : $\Delta Ct = ((Ct_{18-2_{LOX2}} - Ct_{18-2_{Act}}) - (Ct_{20-2_{LOX2}} - Ct_{20-2_{Act}}))$). La figure 16 représente la moyenne des valeurs relatives des différents possibilités (quatre) de rapport entre deux répétitions de *Xcm* 18 et *Xcm* 20 (moyenne de : *rep1 Xcm* 18/ *rep1 Xcm* 20 et *rep1 Xcm* 18/ *rep2 Xcm* 20 et *rep2 Xcm* 18/ *rep1 Xcm* 20 et *rep2 Xcm* 18/ *rep2 Xcm* 20). Il en ressort que le temps 30 mpi est le temps où l'expression relative de *GhLOX2* dans *Xcm* 18 par rapport à *Xcm* 20 est la plus forte.

2.4 Analyse par PCR quantitative de l'effet des traitements MeJA, SA et Ethylène

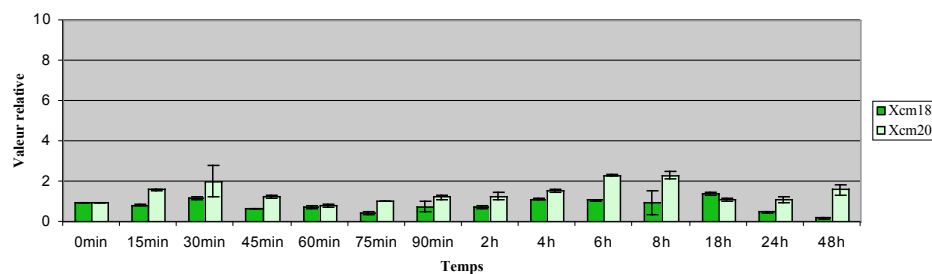
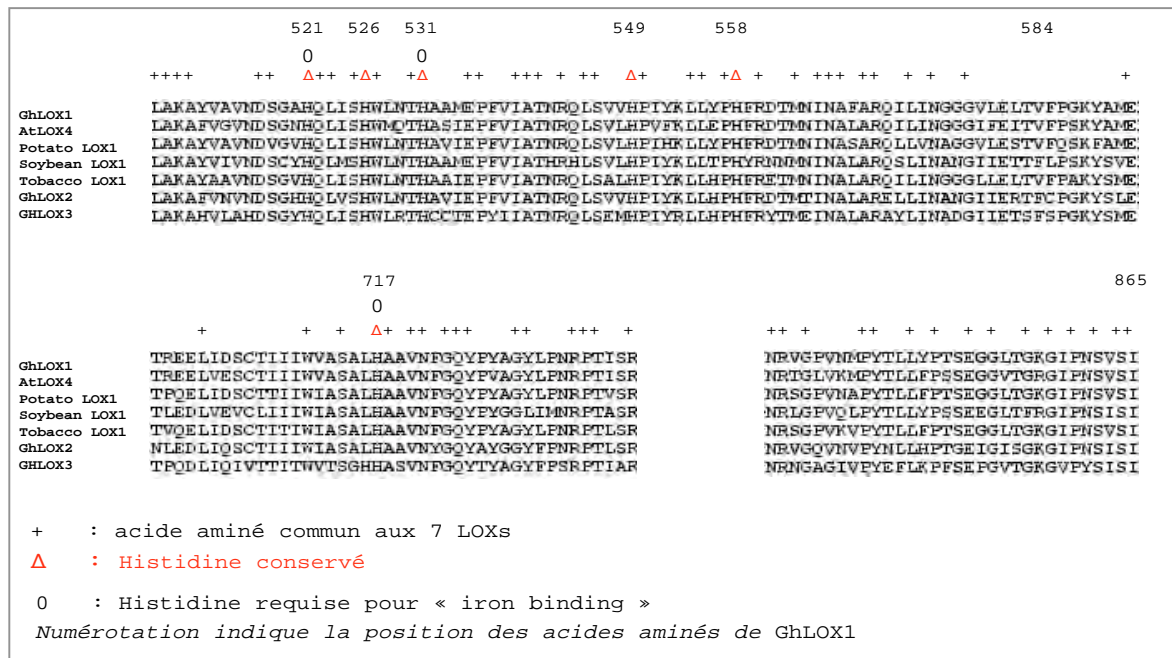
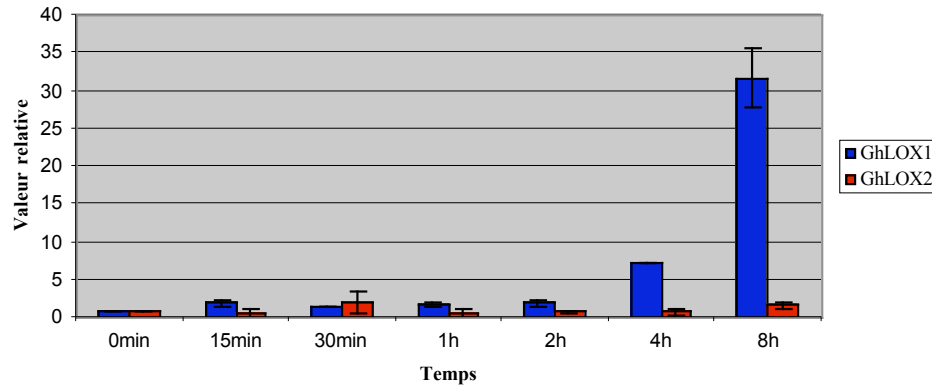
Traitement par le MeJA

Les prélèvements ont été effectués après 1, 2, 3, 4, 5, 6 jours de traitement par vapeurs de MeJA. Les plants « contrôles » ont séjourné dans une mini chambre identique, le même nombre de jours. Les valeurs obtenues par PCR quantitative pour les plantes traitées sont rapportées à leur contrôle correspondant. La formule utilisée est par exemple $\Delta Ct = ((Ct_{JA1_{LOX2}} - Ct_{JA1_{Act}}) - (Ct_{C1_{LOX2}} - Ct_{C1_{Act}}))$, (JA1 = échantillon 1 jour, traité au MeJA et C1 = contrôle 1 jour). Les résultats des valeurs de *GhLOX1* et *GhLOX2* sont présentés en Figure 17. Pour *GhLOX1*, on observe une induction (d'un facteur de 4 à 8) de l'expression de *GhLOX1* pour les trois premiers jours de traitement. L'induction pour *GhLOX2* est beaucoup plus importante ; celle-ci a une valeur relative de 300 fois pour le 3^{ème} jour de traitement. Le niveau d'expression décroît ensuite du 3^{ème} au 6^{ème} jour de traitement.

Traitement par le SA

Les plantes ont été infiltrées par une solution à 0,5 mM de SA . Les prélèvements ont été récoltés après 0, 2, 4 , 6, 8, 10, 12, 15, 18, 24 et 36 heures.

Les valeurs des niveaux d'expression de *GhLOX1* et *GhLOX2* sont présentées en Figure 18. Elles présentent pour chacun d'eux deux pics : à 12 h (facteur 1,5) et 36 h (facteur 2) pour *GhLOX1*, à 2 h (facteur 2) et 15 h (facteur 4) pour *GhLOX2*.



Traitement par l'éthylène

Les cotylédons ont été infiltrés avec une solution d'éthéphon 1mM, dilué dans l'eau. Les prélèvements ont été effectués après 15, 30 min, 1, 2, 4, 8 heures. L'analyse par PCR quantitative montre une très forte induction de l'expression de *GhLOX1* après 8h de traitement (facteur 30), débutant dès 4h (facteur 7) (Figure 19). L'expression du gène *GhLOX2* n'est pas modifiée par le traitement à l'éthylène.

2.5 Identification d'un deuxième gène 13-LOX, *GhLOX3*, présent chez Réba B50

Nous avons recherché dans une base de données EST de cotonnier, DFCI Cotton Gene Index (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=cotton>), des EST présentant un motif de séquence 13-LOX. Plusieurs EST étaient donc candidats et nous avons choisi l'EST TC66769 car la séquence de l'EST était la plus grande. Nous avons ensuite dessiné des amorces spécifiques de cet EST pour ses extrémités 5' et 3' afin d'amplifier TC66769 sur de l'ADN génomique de Réba B50. Le produit PCR a ensuite été purifié et séquencé. La séquence obtenue est identique à la séquence de la base de données avec la présence en plus d'introns. Le gène amplifié a été nommé *GhLOX3*.

La séquence en acides aminés de *GhLOX3* a été alignée à celles de plusieurs LOXs : *GhLOX2*, *GhLOX1* (DQ861284), *AtLOX4* (NP_177396.1), *Potato LOX1* (X79107), *Soybean LOX1* (J02795) et *Tobacco LOX1* (X84040). *GhLOX3* présente des régions conservées de LOX de plantes (Siedow, 1991) (Figure 20). Les histidines requises pour la liaison au fer (iron binding) (Steczko et al., 1992) sont présentes. La séquence en C-terminal présente de fortes similarités avec les autres LOXs.

GhLOX3 est donc un gène *LOX* présent chez Réba B50 qui coderait pour une 13-LOX. Des amorces spécifiques de *GhLOX3* ont été dessinées puis testées pour la PCR quantitative afin d'analyser *GhLOX3* au cours des diverses cinétiques.

2.6 Analyse par PCR quantitative des cinétiques d'infections et des traitements pour *GhLOX3*

Cinétiques d'inoculation avec Xcm

L'expression de *GhLOX3* a été étudiée au cours des deux cinétiques 1 et 2. Son niveau d'expression varie très peu au cours de la cinétique d'infection par *Xcm* 18 ou *Xcm* 20 (Figure 21).

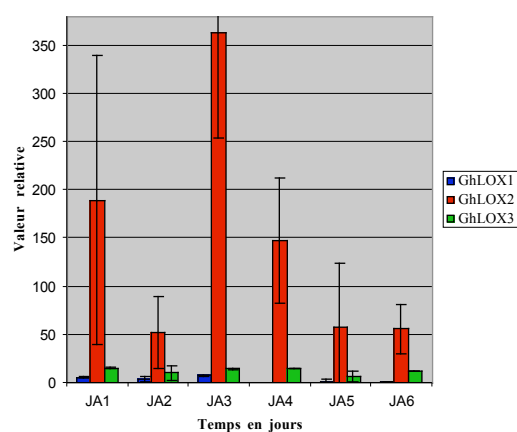


Figure 22: Analyse de l'expression de *GhLOX1*, *GhLOX2* et *GhLOX3* pour des cotylédons traités au Methyl Jasmonate (ratio normalisé par rapport au témoin non traité correspondant; 2 répétitions méthodologiques)

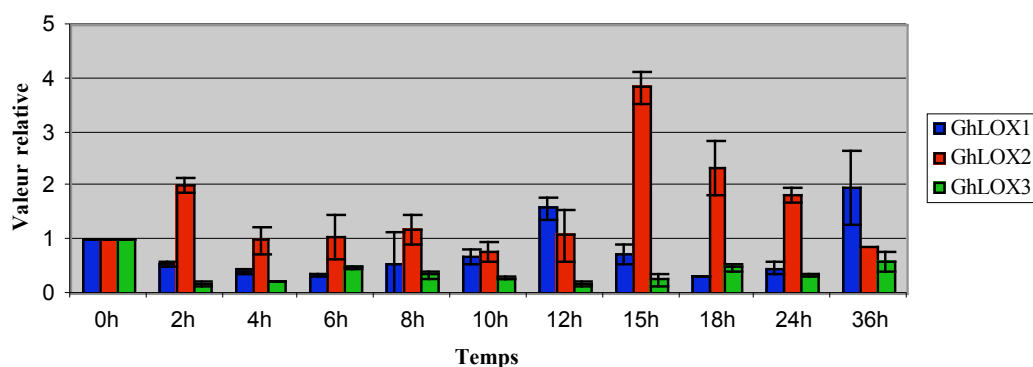


Figure 23: Analyse de l'expression de *GhLOX1*, *GhLOX2* et *GhLOX3* pour des cotylédons traités à l'acide salicylique. L'expression du gène est rapportée au temps T0 (égale à 1) et normalisée par l'expression de *GhAct2* (2 répétitions méthodologiques).

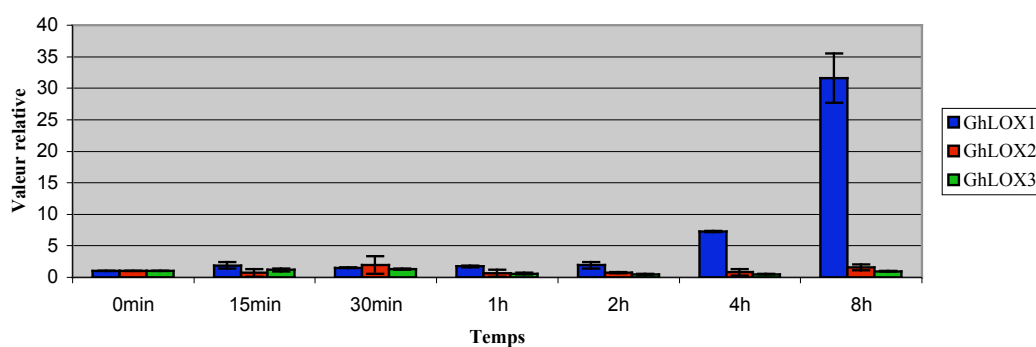


Figure 24: Analyse de l'expression de *GhLOX1*, *GhLOX2* et *GhLOX3* pour des cotylédons traités à l'éthylène. L'expression du gène est rapportée au temps T0 (égale à 1) et normalisée par l'expression de *GhAct2* (2 répétitions méthodologiques).

Traitement par le MeJA

L'expression de *GhLOX3* est stimulée par le traitement dès le premier jour pour atteindre un plateau d'un niveau assez élevé (facteur 15-16) jusqu'au sixième jour (Figure 22). *GhLOX3* est donc beaucoup moins transcrit que *GhLOX2* suite au traitement par MeJA (facteur 300) mais près de 3 fois plus que *GhLOX1* (facteur 5).

Traitement par le SA

L'expression de *GhLOX3* est réprimée suite au traitement par SA, après seulement 2 heures de traitement et se maintient à un faible niveau tout au long de la cinétique (Figure 23). *GhLOX3* réagit donc différemment de *GhLOX1* et *GhLOX2* qui sont eux transcrits plus ou moins abondamment.

Traitement par l'éthylène

L'effet de l'éthylène est quasiment nul sur l'expression de *GhLOX3*, celle-ci ne varie pas (Figure 24). A la différence de *GhLOX1* dont l'expression est très augmentée à 8 hpi, le traitement par l'éthylène n'influe pas sur l'expression des deux gènes 13-LOX, *GhLOX3* et *GhLOX2*.

2.7 Recherche du cDNA pleine longueur de *GhLOX2*

La séquence génomique de *GhLOX2* avait été identifiée préalablement. Nous avons donc voulu amplifier par PCR le cDNA de *GhLOX2* pour le cloner dans un plasmide. Nous avons utilisé comme matrice ADN les RT-PCR obtenus sur les 3 premiers jours du traitement au MeJA. Nous avons réalisé de nombreuses PCR en utilisant de nombreux couples d'amorces ; des amorces *sens* avant l'ATG, des amorces *sens* comprenant l'ATG, des amorces *sens* et *antisens* dessinées au sein de la séquence de *GhLOX2*, des amorces *antisens* dessinées après le codon stop.

Les PCR utilisant les amorces *sens* avant l'ATG, comprenant l'ATG ou commençant au nucléotide 125 n'ont jamais produit d'amplification. Toutes les autres combinaisons de primers ont donnés des résultats satisfaisant de PCR. Le produit d'amplification maximum a été obtenu en utilisant une amorce *sens* commençant au nucléotide 270 et une amorce *antisens* après le codon stop. Ce produit de 2360 nucléotides a été cloné dans un plasmide et séquencé. La séquence obtenue correspond donc à près de 90% de la séquence entière de *GhLOX2* (Annexe 4).

3 DISCUSSION

Les LOX sont les enzymes responsables de la peroxydation des lipides polyinsaturés. L'une d'elles contribue à la mise en place de la RH de la variété de cotonnier Réba B50 à *Xcm* 18, par une peroxydation de type 9-LOX (Jalloul *et al.*, 2002). *GhLOX1*, un gène codant pour une putative 9-LOX, est préférentiellement induit lors de la RH, avant l'activité 9-LOX détectée (Marmey *et al.*, 2007). De plus, *GhLOX1* est aussi exprimé de manière préférentielle lors de la résistance dans diverses combinaisons gène *R* de cotonnier – gène *avr* de *Xcm*, lui conférant ainsi un rôle de marqueur de la RH (Sayegh-Alhamdia *et al.*, 2008).

L'analyse de la séquence d'un gène LOX de cotonnier, *GhLOX2*, cloné à partir d'une banque génomique de Réba B50 au laboratoire, a révélé que ce gène pourrait coder pour une supposée 13-LOX. Lors de la réaction RH du cotonnier à *Xcm*, le JA est produit très tôt (90 min après infection) en amont d'évènements majeurs (burst oxydatif, production de SA, peroxydation des lipides) (Jalloul, 2002; Delannoy *et al.*, 2005). Il a aussi été démontré que l'application de la race virulente (*Xcm* 20) sur des cotylédons de Réba B50 préalablement traités au MeJA conduisait à un phénotype de RH (diminution de la population bactérienne, apparition de symptômes-type) (Marmey *et al.*, 2007). A la lumière de ces données, l'idée que le JA puisse avoir un rôle prépondérant dans la mise en place de la RH chez le cotonnier, a été soulevée. La voie de biosynthèse de JA est aujourd'hui bien détaillée ; elle fait intervenir plusieurs enzymes dont la 13-LOX qui réalise la première étape de la voie de biosynthèse en produisant des 13-hydroperoxydes (La Camera *et al.*, 2004). Il était dès lors intéressant de s'interroger sur le rôle que *GhLOX2* pouvait avoir dans l'installation de la RH du cotonnier à *Xcm*. L'objectif de mon stage a donc été d'apporter des éléments qui permettront de vérifier cette hypothèse.

Notre premier travail a été d'étudier si *GhLOX2* était transcrit suite à une inoculation par *Xcm*. La transcription de *GhLOX1* a été préalablement analysée pour vérifier la mise en place de la RH quand Réba B50 était inoculé par *Xcm* 18. Les résultats de PCR quantitative ont montré que le gène *GhLOX1* était très fortement induit (facteur 5 à 20) lors de l'interaction incompatible, vers 8-18 hpi, confirmant la réaction RH et les profils d'expression de RT-PCR précédemment obtenus (Marmey *et al.*, 2007). L'examen des profils de transcription de

GhLOX2 fait en premier lieu apparaître de fortes valeurs de Ct synonymes de faibles concentrations des transcrits. Au cours de l'infection en situation d'incompatibilité, *GhLOX2* n'est donc que faiblement transcrit, contrairement à *GhLOX1* dont les Ct se rapprochent plus de ceux du gène de référence (*GhAct2*) et dont le caractère constitutif avait été déjà souligné (Marmey *et al.*, 2007). Le niveau élevé des valeurs des Ct pour *GhLOX2* par rapport à ceux de *GhLOX1*, peut expliquer les grands écart-types observés au cours de nos expérimentations. Mais le niveau d'induction des transcrits de *GhLOX2* pour les échantillons *Xcm* 18-30 mpi a constamment révélé un facteur 7 par rapport aux échantillons *Xcm* 20-30 mpi, avec un écart-type faible et donc significatif. L'expression différentielle de *GhLOX2* est donc mise en évidence de manière précoce (30 mpi) par rapport au pic de JA observé ou à l'induction de *GhLOX1*(12 hpi), lors de la RH du cotonnier à *Xcm*.

Il était aussi intéressant de savoir comment *GhLOX2* réagirait à des traitements avec des molécules clés des voies de signalisation de défenses des plantes et notamment JA et SA, déjà identifiées lors de la RH du cotonnier.

Le traitement au MeJA induit des activités LOX chez les plantes (Sembdner et Parthier, 1993), avec l'induction de gènes comme *AtLOX1* ou *AtLOX2* pour *A. thaliana* (Bell et Mullet, 1993), *POTLOX-3* pour *Solanum tuberosum* (Kolomiets *et al.*, 2000), ou *TomLoxD* pour *Lycopersicon esculentum* (Heitz *et al.*, 1997). Mais surtout, il a été montré que les gènes codant pour les enzymes de la voie de biosynthèse de JA sont inductibles par le JA commercial (Wasternack, 2007) ; enfin MeJA exerce une activation de l'expression des gènes par régulation feed-back (Avdiushko *et al.*, 1995).

Chez le cotonnier, l'analyse de plantes traitées au MeJA a révélé d'une part une augmentation modérée de l'expression de *GhLOX1* (facteur 4 à 8), pour les trois premiers jours de traitements, confirmant les résultats antérieurs (Marmey *et al.*, 2007). *GhLOX2* est en revanche très fortement transcrit, avec une augmentation d'un facteur 300, le troisième jour (50 le deuxième jour). L'activité enzymatique LOX analysée sur des plantes issues de ce même traitement (Marmey *et al.*, 2007) a montré, à 48 heures post traitement, qu'elle générerait une plus grande abondance de produits 9- et 13-hydroperoxydes par rapport au témoin non traité. *GhLOX2* est donc induit par le MeJA et pourrait expliquer l'activité 13-LOX détectée. La manière dont le JA participe à la réorientation de l'expression du génome conduisant à la réponse de défense chez les plantes reste largement inconnue. Mais des travaux récents ont identifié des éléments de signalisation, les facteurs de transcription de la famille AP2, qui

stimulent de manière coordonnée l'expression d'une dizaine de gènes nécessaires à la production d'alcaloïdes monoterpéniques indoliques en réponse aux éliciteurs et au JA (Menke et al., 1999; van der Fits et Memelink, 2000). Ces facteurs de transcription sont aussi présents chez *G. hirsutum* (Qiao et al., 2008). Récemment, il a été montré que certains étaient préférentiellement induits lors de la RH de Réba B50 avec *Xcm* 18 (Champion, résultats non publiés).

L'hormone SA joue un rôle central dans la résistance des plantes (Delaney et al., 1994; Ryals et al., 1995), avec de possibles interactions ou coordinations avec d'autres voies de signalisations de défense (Schenk et al., 2000). Dans la RH du cotonnier, le SA est produit localement au site d'infection et de manière systémique (Martinez et al., 2000). Notre étude montre que si *GhLOX1* est induit à 12 hpi comme attendu (Marmey et al., 2007), l'expression de *GhLOX2* est stimulée précocement, après 2 heures (facteur 2), puis plus fortement après 15 heures (facteur 4). L'activité LOX mesurée sur les plantes traitées au SA avait révélé qu'elle était préférentiellement de type 9-LOX, associée à une activité 13-LOX moindre (Marmey et al., 2007). Le faible niveau de transcrits de *GhLOX2* présents dans la plante non traitée, couplé à un faible facteur d'induction (4) après traitement au SA, peut expliquer la faible abondance relative de produits de type 13-hydroperoxydes détectée.

L'éthylène semble aussi fortement impliqué dans la voie de transduction du signal, et notamment dans la résistance des plantes (Ecker, 1995). Les niveaux d'éthylène augmentent dans les cellules végétales lors de l'infection par des agents pathogènes ou après traitements avec des éliciteurs (Grosskopf et al., 1991; Sticher et al., 1997). Le traitement « éthylène » induit uniquement l'expression de *GhLOX1*, d'un facteur supérieur à 30, 8 heures après traitement. *GhLOX2*, en revanche, n'est pas modifiée par ce traitement. La non réactivité au traitement éthylène pourrait suggérer que *GhLOX2* ne répond pas aux éléments éthylène-dépendants, responsables de phénomènes souvent tardifs (exemple la sénescence).

Les différences de réponse de *GhLOX2* par rapport à *GhLOX1* au cours de la RH ou après les divers traitements, suggèrent que ces deux gènes ont une fonction biologique différente. Nous nous sommes alors demandé si *GhLOX2* réagissait différemment de par sa nature 13-LOX.

L'analyse d'une base de données EST (DFCI Cotton Gene Index) nous a permis d'identifier un troisième gène LOX, *GhLOX3*. Ce gène a été séquencé à partir du génome de Réba B50 à

près de 80 % de sa longueur estimée, et présente toutes les caractéristiques de motifs de séquence d'une LOX. La présence d'une phénylalanine en son site actif suppose que *GhLOX3* coderait pour une 13-LOX (Hornung *et al.*, 1999). Les différentes analyses d'expression révèlent que *GhLOX3* n'est pas induit lors de la RH ou de la réaction compatible, ni lors des traitements par l'éthylène ou le SA. En revanche, *GhLOX3* est induit par le traitement au MeJA d'un facteur 15 au maximum. *GhLOX2* et *GhLOX3* réagissent donc de manières différentes lors de l'interaction cotonnier-*Xcm*. Le rôle de *GhLOX3* nous est encore inconnu, mais notre analyse suggère qu'il pourrait être plus impliqué dans le développement, la germination ou le stockage, fonctions aussi attribuées aux LOX (Porta et Rocha-Sosa, 2002) et non en réponse à *Xcm*.

L'induction de *GhLOX2* et *GhLOX1* lors de la RH et la sensibilité différentielle de *GhLOX2* et *GhLOX1* aux traitements par des hormones commerciales, renforce donc l'hypothèse de rôles spécifiques de ces deux gènes en réponse aux stress biotiques, contrairement à la fonction potentielle de *GhLOX3*.

La concomitance de l'induction de *GhLOX2* au cours de la RH (30 mpi) avec l'accumulation de JA (90 min) suggère que cette 13-LOX pourrait être le gène candidat à l'initiation de la biosynthèse de cette hormone en réponse à *Xcm*. L'intervention de *GhLOX2* dans la voie de biosynthèse du JA impliquerait que la protéine GhLOX2 soit compartimentée dans le chloroplaste. En effet, les premières étapes de cette voie de biosynthèse (des lipides acyles-hydrolases aux allène oxyde cyclases) prennent place dans le chloroplaste (Porta and Rocha-Sosa, 2002; La Camera et al., 2004). Un peptide de transit chloroplastique a été mis en évidence pour des gènes 13-LOX comme *AtLOX2* (Bell et Mullet, 1993) ou *PvLOX6* (Porta et al., 2008). La séquence génomique de *GhLOX2* ne révèle pas de tel peptide (résultats non montrés). Cependant, il a été impossible d'amplifier par PCR l'extrémité 5' du cDNA de *GhLOX2*, malgré l'utilisation de nombreuses amorces dessinées à partir de la séquence génomique. L'extrémité 5' de la séquence génomique n'est peut être pas exacte, empêchant de conclure à la présence ou l'absence d'un tel peptide de signal.

.

En conclusion, notre travail a permis d'identifier un gène de 13-LOX qui est induit de manière précoce et spécifique dans la RH du cotonnier. Le temps d'induction (30 mpi)

suggère que *GhLOX2* serait impliqué dans la voie de biosynthèse du JA, produit de manière spécifique lors de la RH à 90 mpi (Jalloul, 2002; Delannoy *et al.*, 2005).

En perspective, plusieurs études peuvent être menées pour conforter l'hypothèse de *GhLOX2* comme précurseur de JA. Il paraît au préalable indispensable de cloner la séquence entière du cDNA de *GhLOX2* pour vérifier la présence d'un peptide de transit chloroplastique. Des études cytologiques pourraient aussi permettre de révéler la présence d'une LOX dans les chloroplastes en utilisant des anticorps spécifiques.

GhLOX2 pourrait ensuite être cloné dans un vecteur d'expression afin de produire la protéine recombinante et confirmer la nature de l'activité 13-lipoxygénase. Une telle expérience est actuellement en cours avec *GhLOX1* (Marmey, résultats non publiés).

Enfin, une analyse fonctionnelle de *GhLOX2* pourrait être entreprise. La stratégie antisens serait privilégiée par rapport au RNAi, au vu des fortes similarités entre séquences de LOX. Une étude sur une stratégie antisens d'une 13-LOX de la pomme de terre, *LOXH1*, montrait que la réduction de *LOXH1* n'avait pas d'effet sur le niveau du JA, mais entraînait en revanche une réduction de la production de composés volatiles C6, autres produits de biosynthèse des 13-LOX chloroplastiques (Leon *et al.*, 2002). Pour *AtLOX2*, une 13-LOX chloroplastique d'*A. thaliana*, et sensible au MeJA et à la blessure (Bell et Mullet, 1993), la stratégie antisens a démontré le rôle de *AtLOX2* dans l'accumulation du MeJA liée à la blessure (Bell *et al.*, 1995). La production de lignées de cotonnier transgéniques antisens pour *GhLOX2*, puis l'analyse de ces lignées pour la production de JA, mais aussi pour l'analyse du phénotype suite à une inoculation avec *Xcm* 18, serait un outil efficace pour définir le rôle exact de *GhLOX2* et du JA dans la mise en place de la RH. Une meilleure connaissance de ce phénomène de résistance naturelle de la plante permettrait une meilleure réflexion pour l'élaboration de stratégie d'amélioration de la culture du cotonnier.

4 MATERIEL ET METHODE

4.1. Matériel végétal et culture du cotonnier

Les graines de cotonnier (*G. hirsutum* cv. Réba B50 (Allen x stoneville 2b)), similaire à la lignée 101-102 B, contiennent les gènes de résistances B₂B₃, pour une résistance à toutes les races de *Xcm*, incluant race 18, exceptée race 20 (Innes, 1983; Hillocks, 1992). Les graines sont traitées à l'acide sulfurique afin d'éliminer les fibres de coton les entourant, puis rincées plusieurs fois à l'eau du robinet. Après séchage, elles sont semées en serre sous lumière naturelle, avec un cycle jour/nuite de 30/25°C et une humidité relative de 80%. Ces conditions sont propices au développement de la bactérie.

4.2. Souches bactériennes et inoculations des plants de cotonnier

Les races de *X. c. pv. malvacearum* (*Xcm*18 et *Xcm*20) sont conservées à -20°C dans le glycérol. Elles sont ensuite cultivées sur milieu gélosé LPGA (extrait de levure 0,5 g/l, peptone 0,5 g/l, glucose 0,5 g/l, agar 15 g/l ; DIFCO, Détroit,MI) à 30°C. 100 à 150 ml de milieu liquide sontensemencés avec 1 ou 2 colonies de la souche utilisée, puis les cultures sont incubées sous agitation (150 rpm) à 29°C pendant près de 18 h. Elles sont ensuite centrifugées 10 min à 8 000 g 4°C, le culot est rincé 2 fois à l'eau du robinet pour éliminer les éléments nutritifs et les exopolysaccharides. Les bactéries sont re-suspendues dans l'eau du robinet avec une concentration ajustée à 10⁸ cfu/ml soit 0,1 de DO à 260 nm.

Les infections sont réalisées par infiltration de la solution bactérienne à l'aide d'une seringue sans aiguille, à la base de la face inférieure des cotylédons âgés de 10 jours. Deux plantes, soit 4 cotylédons, sont infiltrés par la solution bactérienne (race 18, race 20) ou H₂O. Le prélèvement des 4 cotylédons par type d'inoculation (*Xcm* 18, *Xcm* 20, H₂O) se faisait à 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 75 min, 90 min, 2h, 4h, 6h, 8h, 18h, 24h, 48 et 72 h. Trois répétitions biologiques ont été effectuées.

4.3 Traitements des cotylédons avec MeJA, SA et ET

Ces traitements ont été effectués avant mon stage (Marmey *et al.*, 2007). Pour le traitement MeJA, 15 plants (agés de 10 jours) ont été mis sous mini chambre (en plastique transparent) et une solution pure de MeJA a été appliquée sur du papier filtre dans la mini chambre. Les plants ayant servi de contrôle ont séjourné dans une mini chambre identique. Le traitement a duré de 1 à 6 jours. Le traitement avec SA a consisté à injecter la solution (50 µM) dans les cotylédons. Les cotylédons ont été prélevés entre 0 et 48 h. Pour le traitement à l'éthylène, les

cotylédons ont été infiltrés avec une solution d'éthéphon 1mM, dilué dans l'eau. Les prélèvements ont été effectués après 15, 30 min, 1, 2, 4, 8 h.

4.4 Préparation des ARN et transcription inverse

Les cotylédons traités sont congelés à l'azote liquide et conservés à -80°C, puis broyés sous azote. Les ARN totaux sont extraits à l'aide du kit « RNeasy Plant Mini Kit » (Qiagen, France). Lors de la phase finale, les traces d'ADN génomique sont éliminées par un traitement à la DNase et les ARN sont élués avec un volume final de 60 µl d'eau RNase-free. Le dosage des ARN est effectué en mesurant la densité optique au spectrophotomètre, à 260 nm et 280 nm. Le rapport 260/280 permet d'estimer la qualité de l'extraction et la pureté des ARN. Ceux-ci sont dilués au 50^{ème}. La concentration est calculée selon la formule :

$$C(\mu\text{g}/\mu\text{L}) = \text{DO}_{260\text{nm}} \times \text{Dilution} \times 40 \times 1/1000.$$

La transcription inverse des ARNm en ADNc est réalisée à partir de 1µg d'ARN en suivant le protocole du kit « Omniscript RT Kit » (Qiagen, France) dans un volume final de 20 µL.

4.5 PCR quantitative

La quantification des transcrits a été réalisée par PCR quantitative ou qPCR, grâce au thermocycler MX 3500P (Stratagene, Etats-Unis). Des amorces spécifiques ont été dessinées à l'aide du logiciel Beacon Designer (Premier Biosoft International, Etats-Unis). Leur concentration optimale ainsi que leur efficacité a été vérifiée. La qPCR a été réalisée avec le Mesa Green qPCR MasterMix Plus for SYBR Assay (Eurogentec, Belgique) dans un volume total de 20 µL, comprenant 10 µL de Master Mix ; 0,6 µl de chaque amorce qPCR sens et anti-sens à 300 nM ; 4,8 µL d'eau et 4µL d'ADNc dilué 50 fois. Deux réplicats ont été déposés pour chaque échantillon ainsi que des témoins sans ADNc. Le programme PCR utilisé est le suivant : 1 cycle à 95°C/10 min, 40 cycles à 95°C/15 s, 58°C/20 s, 95°C/30 s, 1 cycle à 95°C/1 min, 58°C/20 s, 95°C/30 s. L'expression relative des gènes est calculée grâce au logiciel MxPro (Stratagene, Etats-Unis). Les niveaux d'expression ont été normalisés par rapport à l'actine (*GhACT*) et exprimés par rapport au témoin correspondant.

4.6 Bioinformatique

La recherche des séquences homologues s'est effectuée à partir d'une base de données, DFCI *Gossypium hirsutum* Gene Index (CGI) (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=cotton>). Les alignements ont été réalisés à l'aide du logiciel DNASTar (Madison, USA) ou sur le serveur INFOBIOGEN (<http://bioinfo.hku.hk/services/>).

4.7 PCR et clonage

La réaction PCR s'effectue dans un volume final de 50 μL , contenant 5 μL de tampon 10X, 2,5 μL de dNTP 2 mM, 2,5 μL de chaque amorce 10 μM , 2,5 μL de MgCl_2 4 mM, 0,5 μL de Taq polymérase (Promega) et 2 μL d'ADNc dilué au 1/25 ème.

Le programme de PCR est le suivant : 3 min à 94°C, puis 35 cycles composés chacun de 1 min de dénaturation, 1 min d'hybridation à 50°C et 3 min d'élongation à 72°C, la réaction se terminant par une élongation finale de 10 min à 72°C.

Après vérification de l'amplification sur gel d'agarose, le produit PCR est cloné dans le vecteur pCR 4-TOPO (Invitrogen). Incubation 5 min à T°C ambiante du mélange : produit PCR 4 μL , solution saline 1 μL , vecteur TOPO 1 μL . On ajoute ensuite 2 μL de la réaction aux bactéries *E.coli* chimiquement compétentes (Invitrogen). La réaction est conservée 20 min sur glace, avant d'appliquer le choc thermique : 30 s à 42°C, puis 2 min sur glace. On rajoute ensuite 250 μL de milieu SOC (Invitrogen) et incube la solution 1h à 37°C sous agitation. Les bactéries (20 et 200 μL) sont étalées sur milieu LB avec Ampicilline et placées à 37°C pour la nuit. Quelques colonies sont prélevées, l'ADN plasmidique est extrait et purifié (kit Qiaprep Spin Midiprep Qiagen) avant d'être séquencé.

REFERENCES

- Adams KL, Cronn R, Percifield R, Wendel JF (2003) Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 4649-4654
- Atkinson GF (1891) The black rust of cotton. *Ala Agric Exp Stn Bull* **27**: 1-16
- Avdiushko S, Croft KP, Brown GC, Jackson DM, Hamilton-Kemp TR, Hildebrand D (1995) Effect of volatile methyl jasmonate on the oxylipin pathway in tobacco, cucumber, and *arabidopsis*. *Plant Physiol* **109**: 1227-1230
- Bell E, Creelman RA, Mullet JE (1995) A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 8675-8679
- Bell E, Mullet JE (1993) Characterization of an *Arabidopsis* lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. *Plant Physiol* **103**: 1133-1137
- Bergey DR, Howe GA, Ryan CA (1996) Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals. *Proc Natl Acad Sci USA* **22**: 12053-12058
- Berrocal-Lobo M, Molina A, Solano R (2002) Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant J* **29**: 23-32
- Bird L, Brinkerhoff LA, Davis RG (1981) Bacterial blight. *In* G Watkins, ed, *Compendium in Cotton Disease*. APS Press, Saint Paul, pp 25-28
- Block A, Schmelz E, Jones JB, Klee HJ (2005) Coronatine and salicylic acid: the battle between *Arabidopsis* and *Pseudomonas* for phytohormone control. *Mol Plant Pathol* **6**: 79-83
- Brinkerhoff L, Verhalen L, Johnson WM, Essenberg M, Richardson P (1984) Development of immunity to bacterial blight of cotton and its implications for other diseases. *Plant Dis* **68**: 168-173
- Brinkerhoff LA (1970) Variation in *Xanthomonas malvacearum* and its relation to control. *Annu Rev Phytopathol* **8**: 85-110
- Buhot N (2003) Rôle des élicitines et des protéines de transfert de lipides dans l'induction de la résistance des plantes à leurs agents pathogènes. Université de Bourgogne

- Creelman RA, Tierney ML, Mullet JE (1992) Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 4938-4941
- Dai G, Nicole M, Martinez C, Bresson E, Daniel JF, Andary C, Geiger JP (1996) Flavonoids accumulate in cell walls, middle lamellae and callose-rich papillae during an incompatible interaction between *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (Race 18) and cotton. *Physiol Mol Plant Pathol* **49**: 285-306
- Davis EM, Tsuji J, Davis GD, Pierce ML, Essenberg M (1996) Purification of (+)-delta-cadinene synthase, a sesquiterpene cyclase from bacteria-inoculated cotton foliar tissue. *Phytochemistry* **41**: 1047-1055
- De Feyter R, Yang Y, Gabriel DW (1993) Gene-for-genes interactions between cotton R genes and *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* avr genes. *Mol Plant Microbe Interact* **6**: 225-237
- Delaney TP, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D, Gaffney T, Gut-Rella M, Kessmann H, Ward E, Ryals J (1994) A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* **266**: 1247-1250
- Delannoy E, Jalloul A, Assigbetse K, Marmey P, Geiger JP, Lherminier J, Daniel JF, Martinez C, Nicole M (2003) Activity of class III peroxidases in the defense of cotton to bacterial blight. *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 1030-1038
- Delannoy E, Lyon BR, Marmey P, Jalloul A, Daniel JF, Montillet JL, Essenberg M, Nicole M (2005) Resistance of Cotton Toward *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *Annu Rev Phytopathol* **43**: 63-82
- Eckardt NA (2008) Oxylipin Signaling in Plant Stress Responses. *Plant Cell* **20**: 495-497
- Ecker JR (1995) The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science* **268**: 667-675
- Estur G (2006) World cotton market: trends and outlook. *Cahiers Agricultures* **15**: 9-16
- Feussner I, Wasternack C (2002) The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 275-297
- Flor HH (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annu Rev Phytopathol* **9**: 275-276
- Follin J, Girardot B, Mangano V, Benitez R (1988) Nouveaux résultats sur le déterminisme génétique de la résistance foliaire totale du cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.) à la bactériose *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (Smith) Dye, race 18 et 20. *Cot Fibres Trop* **43**

- Gabriel DW, Burges A, Lazo GR (1986) Gene-for-gene interactions of five cloned avirulence genes from *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* with specific resistance genes in cotton. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 6415-6419
- Grechkin A (1998) Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. *Prog Lipid Res* **37**: 317-352
- Grosskopf D, Felix G, Boller T (1991) K-252a inhibits the response of tomato cells to fungal elicitors *in vivo* and their microsomal protein kinase *in vitro*. *FEBS Lett* **275**: 177-180
- Hammond-Kosack KE, Jones DG (1997) Plant disease resistance genes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 575-607
- Heitz T, Bergey DR, Ryan CA (1997) A gene encoding a chloroplast-targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Physiol* **114**: 1085-1093
- Heitz T, Dhondt S, Gouzerh G, Geoffroy P, Legrand M (2002) Des dérivés d'acides gras dans la résistance des plantes aux attaques microbiennes : à la recherche d'acyl hydrolases impliquées dans la synthèse des oxylipines. *Oléagineux, Corps gras, Lipides* **1**: 37-72
- Hillocks R (1992) Bacterial blight *In* Cotton disease, Ed RJ. Hillocks. CAB Int. Redwood Press, Wallingford, UK, pp 39-85
- Hornung E, Walther M, Kuhn H, Feussner I (1999) Conversion of cucumber linoleate 13-lipoxygenase to a 9-lipoxygenating species by site-directed mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 4192-4197
- Innes N (1983) Bacterial Blight of cotton. *Biol Rev* **58**: 157-176
- Jalloul A (2002) La peroxydation des lipides : origine et rôle dans la mort cellulaire hypersensible du cotonnier (*Gossypium hirsutum*) à *Xanthomonas campestris* (axonopodis) pathovar *malvacearum*. Université Montpellier II
- Jalloul A, Montillet JL, Assigbetse K, Agnel JP, Delannoy E, Triantaphylides C, Daniel JF, Marmey P, Geiger JP, Nicole M (2002) Lipid peroxidation in cotton: *Xanthomonas* interactions and the role of lipoxygenases during the hypersensitive reaction. *Plant J* **32**: 1-12
- Kenton P, Mur LAJ, Atzorn R, Wasternack C, Draper J (1999) Jasmonic acid accumulation in tobacco hypersensitive response lesions. *Mol Plant Microbe Interact* **12**: 74-78
- Kolomiets MV, Chen H, Gladon RJ, Braun EJ, Hannapel DJ (2000) A leaf lipoxygenase of potato induced specifically by pathogen infection. *Plant Physiol* **124**: 1121-1130

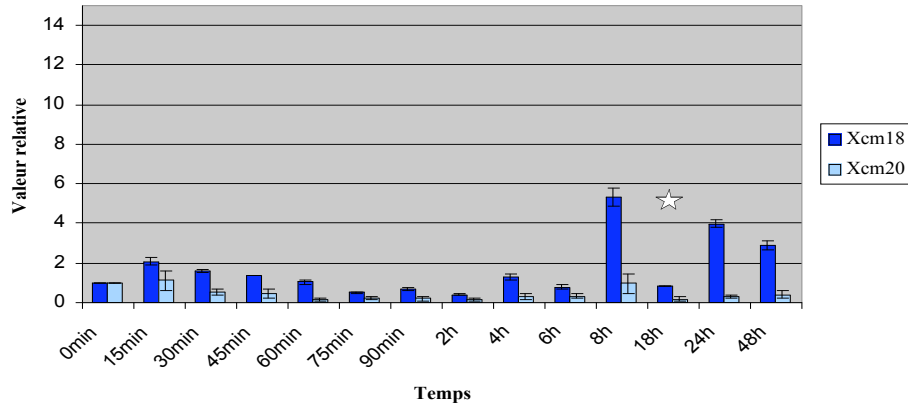
- Konan NGO, Mergeai G (2007) Possibilités d'amélioration de la principale espèce cultivée de cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.) pour la résistance au nématode réniforme (*Rotylenchulus reniformis* Linford et Oliveira). *Biotechnol Agron Soc Environ* **11**: 159-171
- La Camera S, Gouzerh G, Dhondt S, Hoffmann L, Fritig B, Legrand M, Heitz T (2004) Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. *Immunol Rev* **198**: 267-284
- Leon J, Royo J, Vancanneyt G, Sanz C, Silkowski H, Griffiths G, Sanchez-Serrano JJ (2002) Lipoxygenase H1 gene silencing reveals a specific role in supplying fatty acid hydroperoxides for aliphatic aldehyde production. *J Biol Chem* **277**: 416-423
- Li XB, Fan XP, Wang XL, Cai L, Yang WC (2005) The cotton ACTIN1 gene is functionally expressed in fibers and participates in fiber elongation. *Plant Cell* **17**: 859-875
- Lorenzo O, Piqueras R, Sanchez-Serrano JJ, Solano R (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* **15**: 165-178
- Marmey P, Jalloul A, Alhamdia M, Assigbetse K, Cacas JL, Voloudakis AE, Champion A, Clerivet A, Montillet JL, Nicole M (2007) The 9-lipoxygenase *GhLOX1* gene is associated with the hypersensitive reaction of cotton *Gossypium hirsutum* to *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*. *Plant Physiol Biochem* **45**: 596-606
- Martinez C, Baccou JC, Bresson E, Baissac Y, Daniel JF, Jalloul A, Montillet JL, Geiger JP, Assigbetse K, Nicole M (2000) Salicylic acid mediated by the oxidative burst is a key molecule in local and systemic responses of cotton challenged by an avirulent race of *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*. *Plant Physiol* **122**: 757-766
- Martinez C, Montillet JL, Bresson E, Agnel JP, Daniel JF, Geiger JP, Nicole M (1998) Apoplastic peroxidase generates superoxide anions in cells of cotton cotyledons undergoing the hypersensitive reaction to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* race 18. *Mol Plant-Microbe Interact* **11**: 1038-1047
- Menke FL, Champion A, Kijne JW, Memelink J (1999) A novel jasmonate- and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene Str interacts with a jasmonate- and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2. *Embo J* **18**: 4455-4463
- Morel JB, Dangl JL (1997) The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death Differ* **4**: 671-683

- Ndungo V, Demol J, Marechal R (1988) L'amélioration du cotonnier *Gossypium hirsutum* L. par hybridation interspécifique : 1. Phylogénie et spéciation du genre *Gossypium*. Bull Rech Agron Gembloux **23**: 27-49
- Nicole M, Daniel JF, Bresson E, Martinez C, El-Bachir O, Lopez F, Assigbetse K, Fernandez D, Montillet JL, Geiger JP (1998) The hypersensitive reaction of cotton to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. Rec Res Develop Microbiol **2**: 641-654
- Porta H, Figueroa-Balderas RE, Rocha-Sosa M (2008) Wounding and pathogen infection induce a chloroplast-targeted lipoxygenase in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Planta **227**: 363-373
- Porta H, Rocha-Sosa M (2002) Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. Plant Physiol **130**: 15-21
- Qiao ZX, Huang B, Liu JY (2008) Molecular cloning and functional analysis of an ERF gene from cotton (*Gossypium hirsutum*). Biochim Biophys Acta **1779**: 122-127
- Ryals J, Lawton KA, Delaney TP, Friedrich L, Kessmann H, Neuenschwander U, Uknes S, Vernooij B, Weymann K (1995) Signal transduction in systemic acquired resistance. Proc Natl Acad Sci U S A **92**: 4202-4205
- Sayegh-Alhamedia M, Marmey P, Jalloul A, Champion A, Petitot AS, Clérivet A, Nicole M (2008) The lipoxygenase response is associated with resistance of various cotton genotypes to the bacterial blight disease. J. Phytopathol sous presse, doi: 10.1111/j.1439-0434.2008.01409.x
- Schenk PM, Kazan K, Wilson I, Anderson JP, Richmond T, Somerville SC, Manners JM (2000) Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. Proc Natl Acad Sci U S A **97**: 11655-11660
- Sembdner G, Parthier B (1993) The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **44**: 569-589
- Shnathorst WC, Halisky PM, Martin RD (1960) History, distribution, races and disease cycle of *Xanthomonas malvacearum* in California. Plant Dis Rep **44**: 603-608
- Siedow JM (1991) Plant lipoxygenase: Structure and function. Annu Rev Plant Mol Biol **42**: 145-188
- Staskawicz BJ, Ausubel FM, Baker BJ, Ellis JG, Jones JD (1995) Molecular genetics of plant disease resistance. Science **268**: 661-667

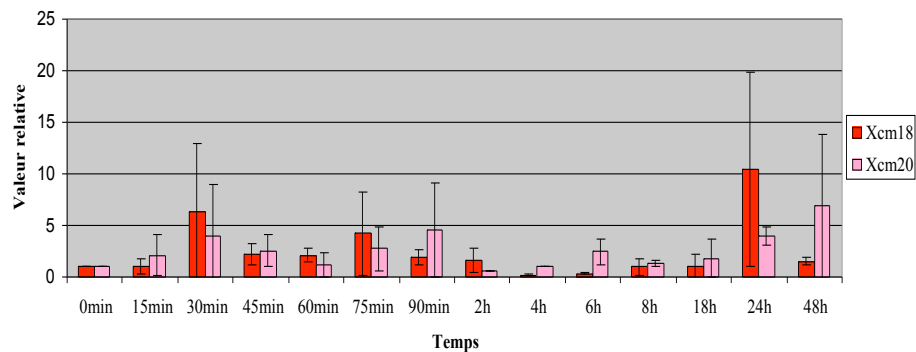
- Steczko J, Donoho GP, Clemens JC, Dixon JE, Axelrod B (1992) Conserved histidine residues in soybean lipoxygenase: functional consequences of their replacement. *Biochemistry* **31**: 4053-4057
- Sticher L, Mauch-Mani B, Metraux JP (1997) Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* **35**: 235-270
- Texier PH (1996) Le coton oléagineux en Afrique. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides* **3**: 111-113
- van der Fits L, Memelink J (2000) ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science* **289**: 295-297
- Voloudakis A, Marmey P, Delannoy E, Jalloul A, Martinez C, Nicole M (2006) Characterization of Superoxide Dismutase (SOD) genes of cotton during its interaction with *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *Physiol Mol Plant Pathol* **68**: 119-127
- Wasternack C (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot (Lond)* **100**: 681-697
- Wendel JF, Cronn RC (2003) Polyploidy and the evolutionary history of cotton. *Adv Agron* **87**: 139-186
- Zomorodian A, Rudolph K (1993) *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*: cause of bacterial blight of cotton. In EC JG Swings, ed, *Xanthomonas*. Chapman & Hall, London, pp 25-30

ANNEXES

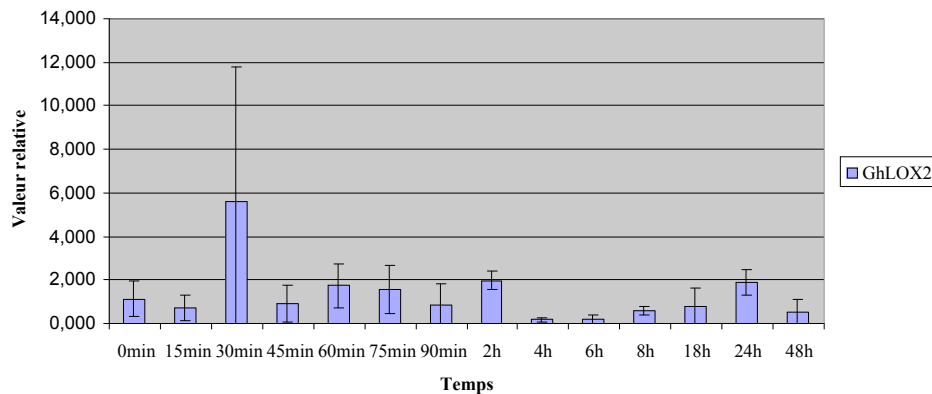
Annexe 1: Analyse de l'expression de *GhLOX1* par qPCR, pour des cotylédons infiltrés avec *Xcm* 18 ou *Xcm* 20 au cours de la cinétique 1. L'expression de *GhLOX1* est rapportée au temps T0 (égale à 1) et normalisée par l'expression de *GhAct2* (2 répétitions méthodologiques). ☆ L'inoculation de l'échantillon *Xcm*-18 hpi avait lieu à 16 heures, contrairement à tous les autres échantillons inoculés entre 10 et 12 heures. La faible expression au temps 18h peut être due à une infiltration moins efficace en fin de journée, ou une moins bonne conservation de la solution bactérienne.



Annexe 2: Analyse de l'expression de *GhLOX2* par qPCR, pour des cotylédons infiltrés avec *Xcm* 18 ou *Xcm* 20 au cours de la cinétique 1. L'expression de *GhLOX2* est rapportée au temps T0 (égale à 1) et normalisée par l'expression de *GhAct2* (2 répétitions méthodologiques).



Annexe 3: Analyse de l'expression de *GhLOX2* par qPCR pour des cotylédons infiltrés avec *Xcm* 18 ou *Xcm* 20 au cours de la cinétique 1. L'expression de *GhLOX2* est le ratio des valeurs d'expression obtenues pour *Xcm* 18 sur celles de *Xcm* 20 pour un même temps après inoculation.



Annexe 4: Séquence de *GhLOX2* déduite du produit d'amplification PCR. La PCR a été réalisée sur de l'ADNc issu de RT-PCR de cotylédons traités au Methyl Jasmonate, en utilisant des primers spécifiques de *GhLOX2*. La séquence représente près de 90% de la séquence entière présumée.

```

Y W N L T Y T P L L A G D D S L Y K V S F E W D E E F G I P
TGGAGCTATCATCTACGAAATAATCATACGGCTGAGTTTTTCTTAAAAACAATTACTCTTGAAAATGTTCTTGGCGAAGGTCCGATCCA 180
G A I I L R N N H T A E F F L K T I T L E N V P G E G R I H
CTTCGTTTGTAAATTCCTGGGTTTATCCTGATAGACGATATAAAAAACACGAATCTTCTTCTCAAACAAGACATACCTTCCACATGAGAC 270
F V C N S W V Y P D R R Y K K P R I F F S N K T Y L P H E T
ACCAGCAGCGTTGCGTAAATACAGAGAAGAAGAGTTACAGGCTCTTGGGGGAGATGGGACTGGACAGTTGAAAACAGGAGATCGTGTTTA 360
P A A L R K Y R E E E L Q V L R G D G T G Q L K T G D R V Y
TGACTATGCTCTGTACAATGATTTGGGTGATCCCGATAAGGGTCAGATCTCGCTCGTCGGTCTTGGAGGTTCCGCTCAGTATCCTTA 450
D Y A L Y N D L G D P D K G A D L A R P V L G G S A Q Y P Y
TCCTCGGAGAGGAAGAACCAGCAGACCACCTTCCAAACAGATCCAAAGACAGAGAGCAGGCTTTTCTACCGAATATTCTTAACGTTTA 540
P R R G R T S R P P S K T D P K T E S R L F L P N I L N V Y
CGTCCCACGAGATGAGCAGTTTGGCTCACTTGAAGCTGTTCGGACTTTTATGGCTTATAATCTGAAAGGCTTAGTTAATCAATCATACCAAT 630
V P R D E Q F A H L K L S D F I A Y N L K G L V N Q I I P L
ACTGGAAGCTTTTGTAACTATACTCCTAATGAGTTCGACTCATTTAAAGACGTGGACAATCTCTTCTCAATGGACTCCCACTTCTCTAC 720
L E A F V N Y T P N E F D S F K D V D N L F F N G L P L P T
TGATCTTATCAATCAAGTTGCTAACAACATCCCTTTAGAGATGATGGGGAGTTTTTCCGATCTGATGGCCAGCAACTCTTAAAAATTTCC 810
D L I N Q V A N N I P L E M M G E F F R S D G Q Q L L K F P
TGTGCCTAAACTGATTGAAGATCGGAGTAATCCCTTTGCATGGAGGACTGATGAAGAATTTGGCAGAGAAATGCTTGCAGGATTGAACCC 900
V P K L I E D R S N P F A W R T D E E F G R E M L A G L N P
TCTTCTTATTACAGCTCCTCAAAGAATTCCTCCAGTGAGCAACTTAGATCTCAAGTGTATGTTAATCAGGACAGTTCAATAACCAACA 990
L L I Q L L K E F P P V S N L D P Q V Y V N Q D S S I T K Q
AGACATCGAGTATACTTAGATGGACTTACTGTGAGGAGGCACTGACGAGCAAAAGGCTATTTATATTGGACCATCACGACACACTTAT 1080
D I E Y N L D G L T V E E A L T S K R L F I L D H H D T L M
GCCTTACCTTAAGACGATAAACGAGTATACAGAAACAAAGACATATGCATCTAGGACAATCTGTTCTTGAGAGGGGATAATACATTGAA 1170
P Y L K T I N E Y T E T K T Y A S R T I L F L R G D N T L K
GCCAGTGGCCATTGAATTTGAGCTTGCCAAAAATGGAAGGAGATAAAATTTGGATGCGTTAGCGAAGTATACACTCCAGCTGAACATGGAGT 1260
P V A I E L S L P K M E G D K I G C V S E V Y T P A E H G V
TGAGGGTTGGATTTGGCAGCTTGCTAAAGCTTTTGTAAATGTGAATGATTCTGGTCACCATCAGCTAGTGAGCCACTGGTTGAACACTCA 1350
E G W I W Q L A K A F V N V N D S G H H Q L V S H W L N T H
TGCAGTGTAGAGCCATTGCTGATTGCAACAAACAGACAGCTGAGTGTGGTTTATCCAGTCTATAAGCTTCTCCATCCTCACTTCCGTGA 1440
A V L E P F V I A T N R Q L S V V H P V Y K L L H P H F R D
CACCATGACTATTAAATGCATTGGCTAGAGAATTGCTCATTAAATGCTAATGGAATTATAGAGAAGACATTTTGTCTGGAAAAATACTCTCT 1530
T M T I N A L A R E L L I N A N G I I E K T F C P G K Y S L
AGAGATGTCTCTGTAATTTACAAGAGTTGGAATTTTATTGATCAGGCTCTTCCCAATAATCTCAAGAAAAGAGGGATTGCAGATGGTGA 1620
E M S S V I Y K S W N F I D Q A L P N N L K K R G I A D G D
TATCAATTTCTCTGGATGACCTTGACCGACTATTGATAAAAGACTACCCATACGCTGTTGATGGGTTGAAGATCTGGTTTGTATTGAAAA 1710
I N S L D D L D R L L I K D Y P Y A V D G L K I W F A I E K
ATGGGTCAGAGATTACTGCTCATTCTACTACAAGACCGATGAAATGGTTCAACGGGACCCGAAATTCAGGCTGGTGAAGGAACCTCCG 1800
W V R D Y C S F Y Y K T D E M V Q R D P E I Q A W W K E L R
AGAGGTGGGTGATGGTGACAAGAAAACGACCCATGGTGGCTTAAATGCAGAACCTTGAAGACCTGATTCAATCTTGCACCATTATCAT 1890
E V G H G D K K N D P W W P K M Q N L E D L I Q S C T I I I
ATGGATCGCTTCTGCACTCCATGCAGCTGTCAACTACGGACAATACGCCCTACGGAGGCTACTTCCCAACCGCCCAACACTAAGCCGAAG 1980
W I A S A L H A A V N Y G Q Y A Y G G Y F P N R P T L S R R
GTTTCATGCCTGAGAAAGGCACCCCTGAGTATGCAGAGCTTGAAGAAGACCTGAGAAGGTCTTCTTTAGAACCATGTCTTCGCAGCTGCA 2070
F M P E K G T P E Y A E L E K N P E K V F F R T M S S Q L Q
ATCCCTGACCGTCATTACGGTGTCTCGAAACGCTGTGCAACACGCATCGGATGAGGTGTATCTTGACAAACGAACCCCACTGGACCAC 2160
S L T V I T V L E T L S N H A S D E V Y L G Q R T P N W T T
CGATGCAATTCCTTAGCAGCTTCCGATGCTTTCAATAAGAGACTTGCTGAAATTTGAAGGGGAAATCTTAAAGATGAACACAGACAAGAC 2250
D A I P L A A S D A F N K R L A E I E G E I L K M N T D K T
ATTGAAGAACAGGGTTGGTACCGTCAATGTTCTTTATAATTTGCTTTTATCCAACAGGTGATGTTGGCATTCTTGGCAAGGGAATTCCAA 2340
L K N R V G T V N V P Y N L L Y P T G D V G I S G K G I P N
TAGCATCTCAATCTAA
S I S I .

```

